

Zum Kupferhaushalt des Flußkrebses

Orconectes limosus

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dietrich Warnatsch

aus Berlin

1960

Druck:
ERNST-REUTER-GESELLSCHAFT
der Förderer und Freunde der Freien Universität Berlin e. V.
DISSERTATIONS-DRUCKSTELLE
1 Berlin 33, Garystr. 45

Zum Kupferhaushalt des Flußkrebses

Orconectes limosus

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Dietrich Warnatsch

aus Berlin

1. Referent : Prof. Dr. K. URICH
2. Referent : Prof. Dr. G. KÜMMEL

Tag der mündlichen Prüfung : 8. Februar 1968

Tag der Promotion :

11. Mrz. 1968



Inhaltsverzeichnis

Einleitung

1. Zur Bedeutung des Kupfers für die Organismen1
2. Die Intentionen der vorliegenden Arbeit1

Material und Methoden

1. Das Versuchsobjekt, Fang, Haltung und Fütterung3
2. Bestimmung des Kupfergehalts in den Organen3
 - 1) Tötung und Präparation3
 - 2) Homogenisieren3
 - 3) Veraschung und Kupferbestimmung4
3. Bestimmung der Kupferfraktionen
 - 4) Tötung4
 - 5) Homogenisieren5
 - 6) Zentrifugieren5
 - 7) Fraktionierte Fällung5
 - 8) Dialyse, Ultrafiltration, Druckfiltration5
 - 9) Gelfiltration6
 - 10) Disc-Elektrophorese7
 - 11) Kupferbestimmung12
 - 12) Proteinbestimmung12
4. Statistische Methoden12

Ergebnisse

1. Zum Kupfergehalt des Flußkrebsses14
 - 1) Verteilung des Kupfers auf die Organe19
 - 2) Geschlechtsunterschiede19
 - 3) Jahreszeitliche Veränderungen des Kupferspiegels..21
 - 4) Veränderungen zur Zeit der Häutung30
2. Experimentelle Beeinflussung des Kupferspiegels32
 - 5) Haltung in deionisiertem Wasser und Hunger32
 - 6) Kupfer im Außenmedium35
 - 7) Kupferinjektion in das Blut40
 - 8) Kupfergaben in den Magen43

3. Das Verhältnis von "freiem" zu gebundenem Kupfer

- 9) Ergebnisse aus Ammonsulfatfällungen - Ultrafiltrationen - lang- und kurzzeitigen Dialysen - Disc-Elektrophoresen - Druckfiltrationen von Blut und Mitteldarmdrüse46

4. Kupferproteide

- 10) Präparative Darstellung des Hämocyanins und Apohämocyanins n. Gelfiltration d. Blutes47
- 11) Kupferproteide in Hämolymphe und Mitteldarmdrüse48

D i s k u s s i o n und vergleichende Betrachtung

1. Kupfergehalt der Tiere

- 1) Kupfergehalt der Tiere51
- 2) Jahreszeitliche Änderungen des Kupferspiegels....54
- 3) Einfluß der Häutung54
- 4) Geschlechtsunterschiede56

2. Experimentelle Beeinflußbarkeit des Kupferspiegels

- 5) Einfluß des Hungerns56
- 6) Beeinflussung durch Kupfer des Außenmediums57
- 7) Toxizität des Kupfers58

3. Zur Form des Kupfers im Organismus

- 8) Das Verhältnis von "freiem" zu gebundenem Kupfer63
- 9) Kupferproteide64
- 10) Hypothese zur Hämocyaninsynthese des Flußkrebses67

Z u s a m m e n f a s s u n g69

Schrifttum72

Die vorliegende Arbeit entstand auf Anregung von Herrn Prof. Dr. K. URICH und wurde in der Zeit von Februar 1965 bis Februar 1967 am II. Zoologischen Institut der Freien Universität Berlin angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. K. URICH für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes und die wissenschaftliche Anleitung.

Es wurden Leihgaben der Deutschen Forschungsgemeinschaft und des Instituts für Bienenkunde der Technischen Universität Berlin an Herrn Professor URICH benutzt.

Die Arbeit wurde durch ein Promotionsstipendium der Stiftung Volkswagenwerk gefördert, der ich hier meinen aufrichtigen Dank sage. Ich danke außerdem Herrn Dr. BELTZ vom Institut für Genetik der Freien Universität für die Anleitung zur Berechnung der LD₅₀.

E i n l e i t u n g

1. Zur Bedeutung des Kupfers

Kupfer ist ein Spurenelement essentieller Bedeutung, dem, wie anderen Schwermetallionen, auch eine toxische Wirkung auf das lebende System zukommen kann, wenn es in ungewöhnlichen Mengen dargeboten wird. Kupfer wurde in pflanzlichen und tierischen Organismen nachgewiesen. Es ist Bestandteil einer Reihe von Enzymen (z.B. Tyrosinase, Polyphenol-Oxydase, Laccase) und erfüllt in den Hämocyaninen vieler Wirbelloser (Arthropoden und Mollusken) die Aufgabe der Bindung von Atemgasen, eine Funktion, die der Bedeutung des Eisens in den Hämoglobinen entspricht.

2. Die Intentionen der vorliegenden Arbeit

Es erschien interessant, die Fragen des Kupferhaushaltes gerade an einem Wirbellosen, Orconectes limosus, zu untersuchen, der in seiner Hämolymphe Hämocyanin-kupfer besitzt und für den bereits die ersten Voruntersuchungen einen auffällig hohen Kupfergehalt erwiesen. Der Flußkrebis ist außerdem als Versuchsobjekt besonders geeignet, denn er ist gut präparierbar und kann aus der Berliner Havel für die Untersuchungen direkt bereitgestellt werden. Der Häutungszyklus der Krebse läßt bestimmte Stoffwechselmarken erwarten. Orconectes limosus ist außerdem Objekt einer Vielzahl anderer systematischer stoffwechsel-biochemischer Untersuchungen des Instituts.

Obwohl es eine Reihe von Arbeiten an verschiedenen Wirbellosen über die Hämocyanine, Kupfergehalte bestimmter Organe und die letalen Dosen des Kupfers gibt, wissen wir bisher nur wenig über vollständige Kupferverteilungen auf alle Organe, über deren Veränderlichkeit innerhalb eines Jahres und während der Häutung, über die Verhältnisse niedermolekularen Kupfers zu proteingebundenem Kupfer, sowie über den Mechanismus der toxischen Wirkungen oder gar über den Kupfertransport und die Synthese von Kupferproteiden bei Wirbellosen.

Die vorliegende Arbeit versucht , einer Reihe von Detailfragen zum Kupferhaushalt an einem Objekt konsequent nachzugehen und Voraussetzungen für eine spätere Untersuchung der Hämocyaninsynthese (auf einem methodisch anderen Niveau) zu schaffen.

Das Experiment wurde vier Hauptintentionen untergeordnet, der Frage nach

1. den Kupfergehalten in den Organen, ihrer Veränderung im Verlaufe eines Jahres und unter dem Einfluß der Häutung,
2. der experimentellen Beeinflußbarkeit des Kupferspiegels,
3. dem Verhältnis von "freiem" zu gebundenem Kupfer und
4. der Frage nach Existenz und Natur eventueller Kupferproteide.

1. Das Versuchsobjekt, Fang, Haltung und Fütterung

Versuchsobjekt war der bei uns heute einheimische Flußkreb Orconectes limosus RAFINESQUE (= Cambarus affinis SAY). Die Tiere häuten sich in der Zeit von Juni bis September. Eiablage und Kopulation finden im Oberflächenwasser bei Temperaturen oberhalb 10°C statt.

Die Flußkrebse wurden von Fischern aus der Berliner Havel bei Spandau und Tegel gefangen, direkt den Untersuchungen zugeleitet oder in Betonbecken bei ständiger Frischluft- und Frischwasserzufuhr ($10 - 12^{\circ}\text{C}$) gehalten. Es wurde mit Herzfleisch gefüttert. Für die Untersuchungen der jahreszeitlichen Veränderungen des Kupfergehaltes in den Organen wurden die Tiere jeweils am 12./13. der entsprechenden Monate gefangen und erst nach zweitägiger Haltung in Leitungswasser den Analysen unterzogen.

2. Bestimmung des Kupfergehaltes in den Organen

1) Tötung und Präparation

Das Töten der Tiere geschah anfänglich durch Chloroform und später durch Einfrieren. Die Art der Tötung zeigte keinen Einfluß auf den Kupfergehalt.

Bei der Präparation wurden die einzelnen Organe durch Spülen äußerlich von Hämolymphe befreit. Hämolymphe selbst wurde durch Abschneiden des vorletzten linken Laufbeines aus lebenden Krebsen gewonnen. Als "Restkreb" wurde bei der Präparation ein Krebskörper verworfen, dem Antennendrüse, Mitteldarmdrüse, Herz, Mandibelmuskeln, Kiemen, Magen, Enddarm, Schwanzmuskel, Ovar bzw. Vas deferens, der im Pleon liegende Teil des Bauchmarks, etwa ein Milliliter Hämolymphe, die Hypodermis unter dem Carapax und die Hälfte des Carapax entnommen waren.

2) Homogenisieren

Die Organe wurden unmittelbar nach der Präparation gewogen, mit dem Atomixmill homogenisiert und darauf in trockengewichtskonstante Gläser zur Trockengewichtsbestimmung überführt. Getrocknet wurde bei 102°C .

3) Veraschung und Kupferbestimmung

Es wurde eine nasse Veraschung mit 1 Teil konzentrierter Schwefelsäure und 2 Teilen konzentrierter Salpetersäure (HINSBERG-LANG 1957, S. 39) über der Flamme durchgeführt, um gebundenes Kupfer in eine dem Kupferreagenz zugängliche Form zu überführen. Selbsttätige Veraschungen in elektrischen Veraschungsgestellen, z.B. mit Selen-Schwefelsäure, erwiesen sich im Hinblick auf die nachfolgende Kupferbestimmung als ungeeignet.

Zur Kupferbestimmung diente ein Verfahren von EDEN und GREEN (1940) mit Natriumdiäthylthiokarbamat im Originalansatz. Der Farbkomplex wurde 30 Sekunden mit 2,5 ml Amylalkohol ausgeschüttelt und abgehoben. In Erweiterung der Originalangaben wurde 10 Minuten vor der Photometrie die Amylalkoholfraktion mit einer Spatelspitze wasserfreien Natriumsulfates zur Entfernung restlichen Wassers (verfälscht die Extinktionen) ausgeschüttelt.

Zu jeder Kupferbestimmung wurde ein Organ-Nullwert (gleicher Ansatz, aber ohne Farbreagenz) mitgemessen, da sich, im Gegensatz zu allen Angaben, herausstellte, daß geringe Eigenextinktionen der Veraschungslösungen ebenfalls in die Amylalkoholphase gehen. Die Ergebnisse wurden durch diese Nullwerte korrigiert. Mitlaufende Standards ($\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, in gleicher Weise behandelt wie die Organe) dienten zur Kontrolle. Die Photometrie erfolgte am EPPENDORF-Photometer bei 432 nm in 2 ml Küvetten. Die Eichkurven für Kupfer verlaufen linear. Einer Extinktion von 0,100 nm entsprechen $5,9 \mu\text{g}$ Kupfer. Der relative Fehler liegt bei $\pm 1,2 \%$.

3. Bestimmung der Kupferfraktionen

4) Tötung

Es sei vorausgeschickt, daß sich alle nachfolgenden Untersuchungen auf die Mitteldarmdrüse und das Blut der Krebse beschränken und möglichst bei 0°C durchgeführt wurden. Um den Zeitraum zwischen Tötung und Analyse klein zu halten, wurde durch Zertrennen des Bauchmarks getötet.

5) Homogenisieren

Um die bei den modernen Homogenisatoren auftretenden Scherungskräfte und den Ultraschall zu vermeiden, wurde mit einem Glashomogenisator von Hand gearbeitet, dabei der Zusatz von Puffermedien ganz vermieden und ein Preßsaft aus dem weichen Gewebe der Mitteldarmdrüse hergestellt.

6) Zentrifugieren

Fraktionierte Zentrifugationen ergaben nach 1 Stunde bei 600 g, 1000 g, 20 000 g und 109 000 g stets einen Anteil von 90 % des Gesamtkupfers der Mitteldarmdrüse im Überstand. Es wurden daher für alle Eiweißstrennungen zellfreie Homogenatüberstände verwendet, die sich nach einstündiger Zentrifugation bei 13 000 g auf der Eispirouette ergaben.

7) Fraktionierte Fällung

Zur Fällung der Eiweiße wurde die von vielen Autoren als schonendste Methode beschriebene Ammonsulfatfällung benutzt. Die Fällungen wurden unter ständigem Rühren unter Zusatz von etwas Hyflo Super Cel (Kondensationspunkte) mit Ammonsulfatkonzentrationen von 33 %, 50 %, 75 % und 90 % Sättigung durchgeführt.

8) Dialyse, Ultrafiltration, Druckfiltration

Es wurden Kurz- und Langzeitdialysen gegen stehende und fließende Puffermedien bzw. deionisiertes Wasser in Dialyseschläuchen durchgeführt. Eine in der Institutswerkstatt gefertigte abgeschlossene Dialyse-Einheit gestattete die Dialyse gegen eine nur durch Membranfilter (Ultrafeinfilter der Durchlaßstufe allerfeinst, 20 mm Ø, Nr. 06 52 19, Membranfilter-Gesellschaft/Göttingen) abgetrennte Nachbarzelle bei kontinuierlicher Probenentnahme. Das System wurde durch hängende "Magnetflöhe" ständig gerührt und konnte gekühlt werden :

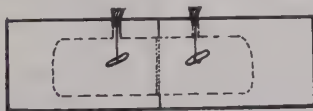


Abb. 1 Dialysezelle

Zur Ultrafiltration wurde ein Glasgerät der Firma SCHOTT & Gen., Mainz benutzt. Die notwendigen Unterdrucke erzeugte eine Wasserstrahlpumpe.

Die Druckfiltration erwies sich als das schonendste Verfahren zur Trennung hoch- und niedermolekularer Fraktionen. Hierzu wurde ein Gerät der Membranfilter-Gesellschaft/Göttingen verwendet, das die Handelsnummer MD 50-15 trägt. Die Druckfiltrationen konnten im Kühlschrank unter Verwendung von Stickstoffdrücken (4 - 8 atü) ausgeführt werden. Als Filterauflage diente das bereits bei der Dialyse erprobte Membranfilter der Durchlaßstufe allerfeinst. Für die Bestimmungen der Anteile niedermolekularen Kupfers durch Druckfiltration wurde der lange Ablaufstutzen des Gerätes durch Verschluß mit Parafilm als Auffangzelle benutzt, wodurch Verdunstungsfehler vermieden werden konnten.

9) Gelfiltration

Das Verfahren sollte der Fraktionierung von Proteingemischen ebenso wie der Abtrennung der hochmolekularen Eiweißfraktion von niedermolekularen Anteilen in Analysenlösungen dienen.

Es wurde im absteigenden Verfahren mit den Sephadex-Typen G-25, G-50, G-75 (für die Trennung in hoch- und niedermolekulare Anteile), G-100, G-150 und G-200 der Firma Pharmacia aus Uppsala experimentiert. Es handelt sich um Trennungen nach Molekülgrößen im Molekülsiebprinzip auf einem dreidimensionalen Netzwerk von Polysaccharidketten des Dextrans.

Die Versuchsanlage ermöglichte eine kontinuierliche Elution, Auffangen der einzelnen Fraktionen in einem Fraktionensammler, Kühlung (4°C), ständige Kontrolle des pH und der Leitfähigkeit und laufende Registrierung des Proteingehalts mit dem UV-Spektrophotometer im Uvicord der Firma LKB. Als geeignetes Elutionsmittel erwies sich ein 1/15 m Phosphatpuffer vom pH 7,4.

Das Verfahren eignete sich jedoch nur zur Blutanalyse, wenn es galt, die Hämocyaninfraktion von den niedermolekularen Anteilen zu trennen. Eine derartige Trennung mit den gleichen Gelen G-25, G-50 und G-75 für Mit-

teldarmdrüsenpreßsäfte bewirkte, daß 25 % des gebundenen Kupfers der Mitteldarmdrüse dissoziierten. Calciumionen drängten diese Dissoziation nicht zurück. Auch vorheriges Aufladen der Gele mit anorganischem Kupfer bzw. vorher der Analysenlösung zugesetztes Kupfer verhinderte diese Dissoziation nicht.

Die Sephadex-Typen G-100, G-150 und G-200 erwiesen sich in dem verfügbaren absteigenden Verfahren für eine Trennung der einzelnen Mitteldarmdrüseneiweiße als ungeeignet, da das hochempfindliche Gelmaterial unter dem Eigengewicht der Säulenpackung und dem Elutionsdruck versackt und eine gleichbleibende Elution verhindert.

10) Disc-Elektrophorese

Es wurde eine Acrylamidgel-Elektrophorese nach Prospekten der Firma Canaco (Canal Industrial Corporation Rockville, USA) verwendet und nach guten qualitativen Proteintrennungen ein Verfahren erarbeitet, das quantitative Auswertungen ermöglicht.

Qualitative Disc-Elektrophorese : Abb. 2

Es wurden 6 Analysen gleichzeitig gefahren (im Kühltank) und nach der Verteilung der Proteinfractionen über die 3 cm lange Gelstrecke sofort (um Diffusion zu vermeiden) mit Amidoschwarz auf Protein bzw. mit Rubeanwasserstoff auf Kupfer gefärbt. Die Proteine werden dabei auf dem Gel fixiert.

Versuche, die Elektropherogramme durch Schneiden der Gele vor bzw. nach der Proteinfärbung quantitativ auszuwerten, blieben wegen hoher Blindwerte unbefriedigend, widersprachen aber späteren quantitativen Befunden in Eluat nicht.

Quantitative Disc-Elektrophorese : Abb. 3

Es wurde eine Disc-Elektrophorese mit kontinuierlicher Elution (zurückgehend auf FLODIN und PORAT 1954) erarbeitet, die bei fortlaufender Elektrophorese die anodisch (basischer Trispuffer) aus dem Gel austretenden Proteinbanden einem Fraktionensammler zuführt. Das Verfahren bot unter den nachgenannten Bedingungen

reproduzierbare Ergebnisse : Die Gelhöhe betrug 3 cm. Es wurde ausschließlich "Lower Gel" verwendet und mit einem Trispuffer vom pH 8,3 gearbeitet. Die Elektrophorese wurde mit 100 V gestartet. Nach 15 Minuten, als die 0,1 ml Analysenlösung vollständig in das Gel eingedrungen waren, wurde bei 200 V die eigentliche Trennung ausgeführt. Die schnellste Proteinbande der Mitteldarmdrüse erreichte bei 20°C und einem Elutionsvolumen von 1,9 ml / Minute eine Wanderungsgeschwindigkeit von 3 cm/h. Die Ausbeute lag nie unter 90 %. Eine Dissoziation des Kupfers war nicht zu beobachten. Folgende Stammlösungen werden zur Gelbereitung benötigt und sind in braunen Flaschen gekühlt aufzubewahren :

(a)	1 n HCl	48,00	ml
	Tris	36,30	g
	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin	0,46	ml
	mit H ₂ O auffüllen auf	100,00	ml
(b)	1 m H ₃ PO ₄	25,60	ml
	Tris	5,70	g
	mit H ₂ O auffüllen auf	100,00	ml
(c)	Acrylamid	30,00	g
	N,N'-Bisacrylamid	0,80	g
	K ₃ Fe (CN) ₆	15,00	mg
	mit H ₂ O auffüllen auf	100,00	ml
(d)	Acrylamid	10,00	g
	N,N'-Bisacrylamid	2,50	g
	mit H ₂ O auffüllen auf	100,00	ml
(e)	Riboflavin	4,00	mg
	mit H ₂ O auffüllen auf	100,00	ml
Tris-Puffer			
	Tris	6,00	g
	Glycin	28,80	g
	H ₂ O	1000,00	ml

Amidoschwarz

Amidoschwarz B 10	0,50	g
Mercurichlorid	5,00	g
Eisessig	5,00	ml
mit Wasser auffüllen auf	100,00	ml

Gelbereitung : "Lower Gel" wird zu gleichen Teilen aus "Lower Gel A" und "B" gemischt. "Lower Gel A" bereitet man aus 1 Teil der Stammlösung (a), 2 Teilen (c) und 1 Teil Wasser. "Lower Gel B" ist eine Lösung von 0,14 g Ammoniumpersulfat in 100 ml Wasser und muß stets frisch angesetzt werden. Das bei der qualitativen Disc-Elektrophorese als Startgel zusätzlich benutzte "Upper Gel" wird aus 1 Teil der Stammlösung (b), 2 Teilen (d), 1 Teil (e) und 4 Teilen Wasser bereitet. Das flüssige "Lower Gel" polymerisiert unter Luftabschluß (mit Wasser) bei 37° C im Trockenschrank (45 Minuten). "Upper Gel" polymerisiert unter Luftabschluß bei UV-Bestrahlung oder im Sonnenschein (15 Minuten).

Arbeitsgang : Zur qualitativen Disc-Elektrophorese (Abb. 2) füllt man zunächst 1,5 ml "Lower Gel" (≈ 3 cm Gelhöhe) in die Glasröhrchen, welche vorher am unteren Ende mit Parafilm verschlossen wurden. Nach Polymerisation im Trockenschrank (s.o.) gießt man das bedeckende Wasser ab, füllt 0,5 ml "Upper Gel" darüber und läßt dieses im UV-Licht polymerisieren. Nach Entfernung des Parafilms und überstehenden Wassers setzt man die Elektrophoreseröhrchen mit den fertigen Gelen in die Apparatur ein, füllt die beiden Elektrodenröge mit Tris-Puffer und kann jeweils 0,1 ml der Analysensubstanz, die man vorher auf eine Rohrzuckerkonzentration von 20 % gebracht hat, durch Unterschichten des Puffers direkt auf die Geloberfläche bringen. "Upper Gel" wird benutzt, um eine möglichst homogene Startlinie an der Grenze zum "Lower Gel" zu erreichen. Man startet die Elektrophorese mit 100 V. Nach etwa 5 Minuten, wenn die Analysensubstanz vollständig in das "Upper Gel" eingedrungen ist, erhöht man die Spannung auf 200 V. Nach 1 Stunde ist die Auftrennung der Mitteldarmdrüsenproteine abgeschlossen, und man

Abb. 2 Qualitative Disc-Elektrophorese

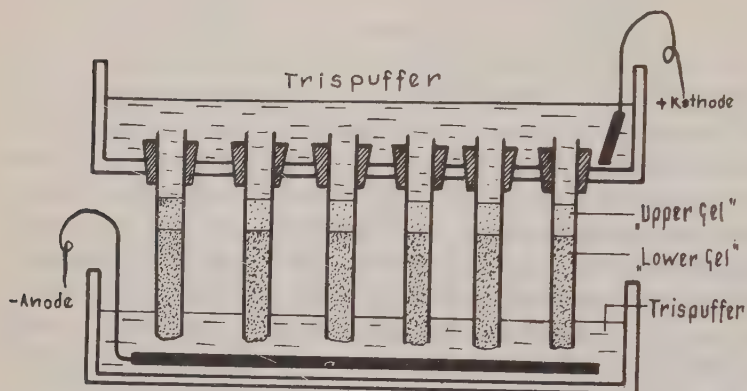
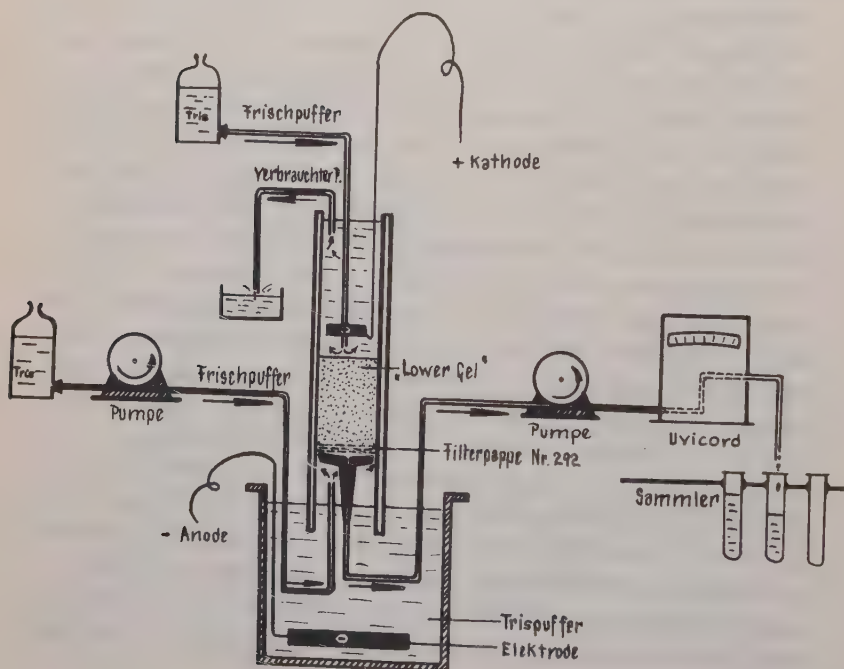


Abb. 3 Disc-Elektrophorese mit kontinuierlicher Elution



stoppt die Elektrophorese vor Austritt der ersten Bande aus dem Gel. Man kann zur Markierung der schnellsten Fraktion der Analysensubstanz Bromphenolblau hinzufügen. Nach Beendigung der Trennung werden die Gele aus den Glasröhrchen entfernt und für 5 - 10 Minuten zur Proteinfärbung in das Amidoschwarz überführt. Die total gefärbten Gele sind darauf wieder in ihre Ausgangsröhrchen einzuführen, um durch 7 %-ige Essigsäure bei 200 V innerhalb von 4 - 6 Stunden zu entfärben (Differenzieren). Für die Färbung auf Kupfer wurden die Gele direkt nach der Auftrennung für 12 - 24 Stunden bei 36° C in eine frische Mischung von 2 - 5 ml 0,1 %-ige Rubeanwasserstoffsäurelösung (abs. Äthanol) und 100 ml 10 %-iger wässriger Natrium-acetat-lösung gegeben. Kupfer färbt sich grünlich-schwarz. (Es handelt sich hier um histologisch übliche Kupferfärbungen, die von OKAMOTO und UTAMURA 1938 entwickelt wurden).

Zur q u a n t i t a t i v e n Disc-Elektrophorese werden Glasrohre mit größerem Durchmesser verwendet. Auch hier wird das untere Rohrende mit Parafilm verschlossen. Dann aber füllt man das Rohr 4 cm hoch mit einer konzentrierten Rohrzuckerlösung, um das darüber zu schichtende "Lower Gel" vom unteren Rohrende entfernt polymerisieren zu lassen. Darauf entfernt man die stützende Rohrzuckerlösung, man bringt ein genau in das Rohr passendes Filtrierpappestück (aus "aschefreiem Filtrierpapier" Nr. 292 von SCHLEICHER & SCHÜLL) in direkten Kontakt unter das Gel und führt dann, wie Abb. 3 zeigt, einen Kunststofftrichter lose unter die Filterpappe. Der äußere Rand des Trichters ist etwas kleiner als der Innendurchmesser des Glasrohres, so daß ihn ein dünner Pufferstrom von außen umspülen kann. Die das Gel verlassenden Proteinbanden werden vom Filter abgeschwemmt und in den Trichter gesaugt, um über das Uvicord zum Fraktionensammler geleitet zu werden. In den Eluaten können die Bestimmungen von Kupfer und Protein vorgenommen werden.

Anmerkung: Im Gegensatz zu der qualitativen Elektrophorese mit ihren großen Puffergefäßen muß bei der quantitativen Elutionselektrophorese ständig zersetzter

Puffer abgesaugt und Frischpuffer auf die Gelpole gepumpt werden. Die von der Firma angegebenen "Large pore Gels" sind wegen ihrer mehr gallertigen Konsistenz für die in den geschilderten Verfahren nötigen Handhabungen ungeeignet.

11) Kupferbestimmung

Es wurde das bereits auf Seite 4 beschriebene Verfahren von EDEN und GREEN (1940) benutzt und auf einen Mikroansatz umgestellt. Dabei können die Proben in den Veraschungsgläsern verbleiben. Nach Hinzufügen von 2 ml 4 %-iger Natriumpyrophosphatlösung, 2 ml konz. Ammoniak und 1 ml 0,5 %-iger Natriumdiäthylthiokarbamatlösung bildet sich der Farbkomplex mit dem Kupfer, welcher mit 1 ml Amylalkohol 30 Sekunden ausgeschüttelt wird. Die Photometrie erfolgt bei 432 nm, kleinem Spalt, in Mikroküvetten. Hier entsprechen einer Extinktion von 0,100 nm 0,50 µg Kupfer, mit einem relativen Fehler von $\pm 1,2 \%$.

12) Proteinbestimmung

Es wurde die Methode nach LOWRY und Mitarbeitern (1951) mit dem Phenolreagenz nach FOLIN und CIOCALTEU benutzt. Die den Extinktionen entsprechenden Proteinwerte wurden einer Eichkurve für kristallines Rinder-Serumalbumin (Sigma) entnommen. Einer Extinktion von 0,100 nm entsprechen 22 µg Rinder-Serumalbumin.

4. Statistische Methoden

Die graphischen Darstellungen zeigen relative Verhältnisse, bei denen in den Abbildungen 4, 5 und 6 der Maximalwert gleich 100 % gesetzt wurde. Die tabellari-schen Werte sind Mittel aus Werten für beide Geschlechter (ausgenommen Tab. 1 und 2). Die Zahl der Einzelwerte (n) ist maximal 10 und wird neben der mittleren quadratischen Abweichung der Einzelwerte vom Mittelwert

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

ebenfalls angegeben. Das Vorliegen statistisch gesicherter Unterschiede zwischen einzelnen Meßreihen wurde durch

die Varianzanalyse geprüft. Zur Bewertung von Unterschieden zwischen zwei Mittelwerten wurde der t-Test benutzt, welcher eine Prüfung auch bei einer kleinen Anzahl von Einzelwerten erlaubt (LINDER 1956; BELITZ 1960).

$$t = \frac{|\bar{x} - \bar{y}|}{\sqrt{\frac{\left[\sum (x - \bar{x})^2 + \sum (y - \bar{y})^2 \right]}{(n_x + n_y - 2)} \cdot \frac{n_x + n_y}{n_x \cdot n_y}}}$$

P-Werte wurden den graphischen Angaben von PÄTAU (BELITZ 1960) entnommen. In der vorliegenden Arbeit soll von einer statistischen Sicherung divergierender Befunde gesprochen werden, wenn ihnen ein $P < 0,05$ zuzuordnen ist. In den Abbildungen wird durch Einkreisen von Punkten innerhalb der Kurven bzw. durch Pfeile zwischen den Kurven männlicher und weiblicher Tiere auf signifikante Unterschiede hingewiesen.

Zur Beurteilung, ob einzelne Meßwerte als "Ausreißer" vernachlässigt werden dürfen, wurde eine Berechnung der Ausreißergrenzen nach GRAF und HENNING (DOERFFEL 1962) vorgenommen:

$$\text{Ausreißergrenze} = \bar{x} \pm g(N, P) \cdot \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

Die g-Werte können für die entsprechenden (N) und das gewünschte P aus Kurven (DOERFFEL 1962) entnommen werden.

In den Haltungsversuchen erfolgte eine Zuordnung der Tiere zu den einzelnen Versuchsansätzen nach zufälligen Zahlen (LINDER 1956), um ein homogenes Ausgangsmaterial zu gewährleisten.

Die mittlere letale Dosis für Kupfermedien (Abb.7), LD_{50} , wurde durch Probit-Transformation berechnet. Eine LD_{50} für injiziertes Kupfer ließ sich aus dem Zahlenmaterial nicht berechnen.

1. Zum Kupfergehalt des Flußkrebsses

Die Versuchstiere kamen direkt aus der Berliner Havel und wurden nach zweitägigem Aufenthalt in Leitungswasser jeweils am 15. des betreffenden Monats getötet und den Kupferbestimmungen zugeführt. Es wurde die Konzentration des Kupfers in den Organen bestimmt und auf 1 Gramm Organtrockengewicht bezogen.

Die Tabellen 1 und 2 geben die mittleren Kupferkonzentrationen der Organe ($\mu\text{g Cu/g}$ Organtrockengewicht) für jeweils 5 männliche bzw. 5 weibliche Flußkrebse in den Monaten September 1965 bis September 1966.

Es wurden auch die Kupfermengen in den Organen der einzelnen Tiere bestimmt und festgestellt, daß die Variationen der Kupferkonzentration (Abb. 4, 5, 6) die Änderungen der Kupfermengen repräsentieren. Von einer den Tabellen 1 und 2 vergleichbaren Angabe mittlerer Kupfermengen mußte jedoch abgesehen werden, da ein Vergleich von Tieren und Organen unterschiedlicher Größe Umrechnungen auf einen Standard-Krebs bestimmten Körpergewichtes voraussetzt, welche bei Verwendung nicht standardisierter Frischgewichtsbestimmungen (unterschiedlicher Feuchtigkeitsgrad, Verdunstungsverluste) fragwürdig erschienen. Lediglich die Angaben der Tabelle 3 gehen auf standardisierte Bestimmungen der Organfrischgewichte zurück (Wägung der Organe 10 Minuten nach Eintauchen in HARREVELD-Lösung, zweimaligem Abtropfen und offener Aufbewahrung in einem Raum normaler Luftfeuchtigkeit). Die Angabe der prozentualen Anteile des Trockengewichtes am Frischgewicht der Organe soll einen Eindruck von den Gewichtsverhältnissen vermitteln und ein Umdenken der Konzentrationsangaben auf Frischgewichte ermöglichen. Die Befunde der Tabelle 3 gehen allerdings ausschließlich auf Bestimmungen in den Monaten Juni und Juli 1966 zurück und repräsentieren nicht die Verhältnisse des ganzen Jahres.

Tab.1 Kupferkonzentration d. Organe im Verlaufe d. Jahres : Mittel aus max. 5 Männchen, $\pm$ s, (n)
 $\mu\text{g Cu/g Organrockgewicht}$

	Antennen- drüsen	Mittel- drüsen	Herz	Mandibel- muskel	Kiemens- drüsen	Magen	Schwanz- muskel	Vas deferens	Bauch- mark	Hämo- lymphe	Carapax	
Sept.	190 ± 62 (5)	3333 ± 400 (4)	506 ± 84 (5)	353 ± 65 (5)	555 ± 38 (5)	1167 ± 252 (5)	337 ± 38 (4)	43 ± 4 (5)	580 ± 107 (5)	1130 ± 177 (4)	1260 ± 170 (5)	18 ± 5 (5)
Okt.	115 ± 18 (2)	2230 ± 319 (5)	139 ± 41 (4)	61 ± 14 (3)	370 ± 120 (5)	686 ± 177 (5)	211 ± 43 (4)	11 ± 4 (3)	62 ± 20 (5)	1114 ± 94 (4)	2005 ± 440 (3)	16 ± 2 (5)
Nov.	140 ± 50 (5)	2566 ± 503 (4)	315 ± 16 (4)	398 ± 73 (5)	572 ± 231 (5)	1215 ± 103 (4)	140 ± 34 (5)	31 ± 9 (4)	178 ± 49 (5)	408 ± 55 (4)	1773 ± 438 (2)	8 ± 2 (3)
Dez.	174 ± 13 (4)	1525 ± 306 (4)	287 ± 93 (4)	167 ± 41 (5)	354 ± 59 (5)	722 ± 73 (4)	166 ± 48 (5)	49 ± 12 (5)	129 ± 43 (5)	408 ± 104 (5)	1773 ± 438 (2)	10 ± 4 (4)
Jan.	168 ± 36 (5)	3374 ± 425 (5)	485 ± 57 (4)	470 ± 59 (5)	474 ± 133 (5)	755 ± 68 (4)	459 ± 26 (4)	45 ± 3 (5)	676 ± 91 (4)	659 ± 192 (5)	888 ± 192 (5)	22 ± 8 (4)
Febr.	276 ± 61 (5)	4158 ± 543 (4)	1931 ± 250 (4)	497 ± 121 (5)	420 ± 113 (5)	1118 ± 355 (4)	343 ± 71 (5)	205 ± 45 (2)	922 ± 155 (3)	1093 ± 303 (3)	1552 ± 292 (3)	42 ± 10 (2)
März	169 ± 41 (4)	2204 ± 681 (5)	1250 ± 348 (4)	412 ± 176 (5)	437 ± 76 (4)	1407 ± 238 (4)	447 ± 138 (5)	56 ± 20 (5)	1991 ± 206 (5)	726 ± 15 (2)	1552 ± 292 (3)	16 ± 4 (4)
April	198 ± 42 (4)	2448 ± 588 (5)	1762 ± 217 (5)	939 ± 325 (5)	530 ± 191 (4)	849 ± 185 (5)	542 ± 167 (5)	48 ± 7 (5)	1737 ± 262 (5)	1831 ± 238 (5)	1220 ± 305 (5)	28 ± 12 (5)
Mai	241 ± 64 (4)	1637 ± 503 (5)	706 ± 149 (5)	231 ± 71 (4)	375 ± 56 (5)	580 ± 144 (4)	314 ± 83 (5)	31 ± 4 (3)	1158 ± 244 (4)	1442 ± 357 (4)	757 ± 89 (4)	27 ± 7 (4)
Juni	221 ± 35 (5)	680 ± 121 (5)	706 ± 168 (5)	323 ± 121 (5)	430 ± 43 (5)	1516 ± 334 (5)	248 ± 97 (4)	27 ± 12 (5)	981 ± 207 (4)	1791 ± 426 (5)	836 ± 264 (5)	44 ± 11 (5)
Juli	339 ± 12 (4)	1167 ± 402 (4)	619 ± 133 (5)	664 ± 209 (4)	520 ± 77 (5)	1413 ± 314 (5)	228 ± 73 (5)	50 ± 10 (5)	733 ± 143 (5)	3194 ± 648 (4)	250 ± 17 (5)	55 ± 12 (5)
Aug.	435 ± 84 (4)	874 ± 233 (4)	1177 ± 291 (5)	935 ± 149 (4)	353 ± 57 (5)	1634 ± 185 (5)	488 ± 57 (5)	105 ± 37 (4)	991 ± 203 (4)	3174 ± 906 (5)	1228 ± 86 (5)	14 ± 6 (5)
Sept.	194 ± 62 (5)	3233 ± 398 (5)	400 ± 67 (5)	130 ± 56 (5)	592 ± 32 (5)	605 ± 140 (5)	153 ± 38 (5)	24 ± 7 (5)	276 ± 56 (5)	2252 ± 462 (4)	1292 ± 165 (5)	16 ± 5 (5)

	Antennen- drüsen		nerz	Handelb- muskel	Enddarm	Magen	Schwanz- muskel	Ovar	Beuch- mark	Hämo- lymphe	Carapax
Sept.	269 $\pm$ 37 (5)	2722 $\pm$ 282 (5)	792 $\pm$ 177 (2)	429 $\pm$ 75 (5)	578 $\pm$ 88 (5)	1040 $\pm$ 157 (5)	211 $\pm$ 51 (5)	67 $\pm$ 18 (5)	1438 $\pm$ 278 (3)	999 $\pm$ 118 (3)	11 $\pm$ 2 (4)
Okto.	237 $\pm$ 85 (4)	3611 $\pm$ 524 (5)	318 $\pm$ 34 (5)	77 $\pm$ 12 (5)	625 $\pm$ 59 (5)	317 $\pm$ 28 (5)	99 $\pm$ 31 (5)	27 $\pm$ 19 (4)	857 $\pm$ 239 (4)	2366 $\pm$ 231 (4)	13 $\pm$ 2 (5)
Nov.	178 $\pm$ 22 (4)	2736 $\pm$ 365 (5)	537 $\pm$ 163 (5)	388 $\pm$ 105 (4)	801 $\pm$ 190 (5)	567 $\pm$ 83 (4)	321 $\pm$ 69 (5)	56 $\pm$ 12 (3)	345 $\pm$ 83 (4)	10 $\pm$ 3 (5)	10 $\pm$ 3 (5)
Dez.	210 $\pm$ 38 (4)	1778 $\pm$ 475 (5)	481 $\pm$ 88 (5)	300 $\pm$ 52 (4)	452 $\pm$ 109 (5)	301 $\pm$ 58 (5)	211 $\pm$ 45 (5)	75 $\pm$ 25 (5)	349 $\pm$ 71 (4)	1319 $\pm$ 63 (3)	9 $\pm$ 4 (5)
Jan.	230 $\pm$ 95 (4)	3522 $\pm$ 599 (4)	453 $\pm$ 98 (5)	318 $\pm$ 81 (4)	569 $\pm$ 88 (4)	701 $\pm$ 152 (4)	225 $\pm$ 80 (4)	53 $\pm$ 15 (4)	615 $\pm$ 185 (4)	6 $\pm$ 2 (4)	6 $\pm$ 2 (4)
Febr.	1456 $\pm$ 224 (5)	4538 $\pm$ 604 (5)	612 $\pm$ 174 (4)	476 $\pm$ 119 (5)	561 $\pm$ 94 (5)	1171 $\pm$ 244 (4)	359 $\pm$ 46 (5)	37 $\pm$ 9 (4)	1200 $\pm$ 263 (3)	4300 $\pm$ 1036 (2)	24 $\pm$ 8 (3)
März	1119 $\pm$ 304 (5)	3529 $\pm$ 564 (5)	1913 $\pm$ 406 (5)	1856 $\pm$ 302 (5)	891 $\pm$ 152 (5)	351 $\pm$ 359 (5)	351 $\pm$ 28 (4)	76 $\pm$ 18 (3)	150 $\pm$ 51 (4)	3265 $\pm$ 9 (1)	49 $\pm$ 9 (5)
April	1118 $\pm$ 242 (5)	2265 $\pm$ 430 (3)	932 $\pm$ 207 (2)	535 $\pm$ 198 (4)	695 $\pm$ 124 (5)	882 $\pm$ 245 (4)	355 $\pm$ 84 (4)	45 $\pm$ 11 (4)	530 $\pm$ 431 (3)	2317 $\pm$ 285 (5)	26 $\pm$ 8 (5)
Mai	437 $\pm$ 68 (4)	1372 $\pm$ 292 (4)	835 $\pm$ 128 (4)	376 $\pm$ 64 (4)	438 $\pm$ 115 (5)	1117 $\pm$ 385 (4)	638 $\pm$ 146 (5)	52 $\pm$ 13 (5)	1287 $\pm$ 246 (5)	2123 $\pm$ 184 (5)	26 $\pm$ 4 (5)
Juni	559 $\pm$ 170 (4)	692 $\pm$ 106 (4)	1546 $\pm$ 139 (5)	1546 $\pm$ 69 (4)	560 $\pm$ 65 (5)	1465 $\pm$ 302 (4)	312 $\pm$ 77 (4)	77 $\pm$ 23 (4)	1387 $\pm$ 564 (3)	1322 $\pm$ 218 (4)	16 $\pm$ 6 (4)
Juli	591 $\pm$ 114 (4)	695 $\pm$ 133 (4)	946 $\pm$ 366 (5)	629 $\pm$ 144 (4)	600 $\pm$ 127 (5)	1003 $\pm$ 280 (4)	279 $\pm$ 82 (5)	76 $\pm$ 23 (5)	999 $\pm$ 1946 (5)	652 $\pm$ 56 (4)	49 $\pm$ 23 (5)
Aug.	521 $\pm$ 107 (5)	656 $\pm$ 98 (4)	780 $\pm$ 260 (4)	780 $\pm$ 245 (5)	404 $\pm$ 144 (5)	958 $\pm$ 265 (5)	362 $\pm$ 94 (5)	60 $\pm$ 24 (5)	1602 $\pm$ 507 (5)	1170 $\pm$ 117 (4)	15 $\pm$ 5 (5)
Sept.	344 $\pm$ 29 (4)	1498 $\pm$ 332 (5)	834 $\pm$ 183 (5)	219 $\pm$ 53 (5)	639 $\pm$ 138 (4)	361 $\pm$ 94 (4)	84 $\pm$ 21 (5)	47 $\pm$ 10 (5)	1687 $\pm$ 378 (4)	1290 $\pm$ 56 (5)	12 $\pm$ 5 (5)

Tab. 3 Prozentualer Anteil des Trockengewichts am Frischgewicht der Organe - geltend für die Monate Juni und Juli 1966 (keine Signifikanz zwischen beiden Monaten)

O r g a n	Organrockengewicht in Prozent des Organfrischgewichtes (%)			
	$\bar{x}$	$\pm$	s	(n)
Antennendrösen	11	$\pm$	2	(20)
Mitteldarmdrüse	23	$\pm$	5	(20)
Herz	10	$\pm$	2	(20)
Mandibelmuskeln	15	$\pm$	1	(20)
Kieme	8	$\pm$	1	(20)
Enddarm	9	$\pm$	1	(20)
Magen	9	$\pm$	1	(20)
Schwanzmuskel	18	$\pm$	2	(20)
Vas deferens	10	$\pm$	2	(20)
Ovar	12	$\pm$	3	(20)
Bauchmark	9	$\pm$	1	(20)
Hämolymphe	9	$\pm$	1	(20)
Carapax	73	$\pm$	2	(20)
Hypodermis	23	$\pm$	3	(20)
neuer Carapax 1 Tag nach der Häutung	42	$\pm$	3	(6)
Magensteine	75	$\pm$	3	(12)

Nach Bestimmungen im September 1966 (n = 6) beträgt das Trockengewicht ganzer Flußkrebse 30 % vom Körperfrischgewicht. Der mittlere Kupfergehalt der Krebse errechnete sich mit 0,004 % des Körperfrischgewichtes bzw. 0,014 % des Körpertrockengewichtes. Die mittlere kupferkonzentration lag bei 42 µg Cu/g Körperfrischgewicht bzw. 140 µg Cu/g Körpertrockengewicht.

Verteilung des Gesamtkupfers : Bestimmt im September
1966, n = 4 , Körper-
gewicht 14 g

Kupfer in den Organen	451 $\mu\text{g Cu}$	$\hat{=}$	77 %
" im Blut	76 $\mu\text{g Cu}$	$\hat{=}$	13 %
" im "Restkrebs"	57 $\mu\text{g Cu}$	$\hat{=}$	10 %

Gesamt tier (14 g)	584 $\mu\text{g Cu}$	$\hat{=}$	100 %
----------------------	----------------------	-----------	-------

Da für die hier untersuchten Krebse eine Blutkupferkonzentration von 28 $\mu\text{g Cu/ml}$ bestimmt wurde, kann aus den 76 μg extrazellulären Kupfers auf ein Blutvolumen der Krebse von 20 % ihres Körpervolumens geschlossen werden. Die 76 μg Kupfer ergaben sich aus der Blutprobe zur Bestimmung der Kupferkonzentration und der Blutmenge des gesamten Waschmediums, mit dem bei der Präparation über einem Trichter alle Organe und der "Restkrebs" (Erklärung auf Seite 3) gründlich von anhaftender Hämolymphe befreit wurden. Ganz sicher kann das hier errechnete Blutvolumen von etwa 20 % nur als eine untere Grenze gewertet werden. Die hier angestellten Berechnungen zum Blutvolumen der Krebse (aufgrund von Kupferbestimmungen) gelten freilich nur unter der Voraussetzung, daß das Kupfer im gesamten Hämolymphraum homogen verteilt ist.

Für die Kupferbestimmungen in den Organen interessiert nun die Frage, wie weit sichergestellt werden kann, daß es sich, unabhängig von Verunreinigungen durch Blutkupfer, überhaupt um intrazelluläres Kupfer der Organe handelt. Hierzu ist zu bemerken, daß die Organe bei der Präparation durch mehrmaliges Eintauchen in HARREVELD-Lösung und deionisiertes Wasser von außen anhaftender Hämolymphe befreit wurden, um Verfälschungen der Organwerte durch Blutkupfer auszuschließen. Derartige Waschungen sind nahezu quantitativ, was spezielle Versuche im Institut durch H. FÖRSTEL bestätigen. Diskutiert man dennoch am oben vorgestellten Beispiel der Verteilung des Gesamtkupfers die Fehlergröße für einen Fall, bei dem die Organe (hier 3,63 g) trotz der Reinigung noch zu 10 % von Hämolymphe erfüllt wären, so wäre

der Kupfergehalt von $451 \mu\text{g}$ um $0,363$ mal $28 \mu\text{g Cu} = 10 \mu\text{g}$ Kupfer zu korrigieren, was einem Fehler von nur 2% entspräche und das Vertrauen in die Kupferbestimmungen der Organe rechtfertigt.

1) Verteilung des Kupfers auf die Organe

Tabelle 4 gibt die Jahresmittel der Kupfermengen ($\mu\text{g Cu/Organ}$) und der Kupferkonzentrationen ($\mu\text{g Cu/g}$ Organtrockengewicht) in den Organen des Flußkrebse. Eine Angabe der mittleren Kupfermengen eines Jahres erschien auch gegen die auf Seite 14 geäußerten Bedenken sinnvoll, da die Jahresmittel der Körpergewichte beider Geschlechter bei den Versuchstieren nur um etwa 2 g voneinander abweichen und daher auch ohne Umrechnung auf einen Standard-Krebs einen Eindruck von den Kupfermengen in den Organen männlicher und weiblicher Flußkrebse vermitteln können.

Nach Tabelle 4 haben Mitteldarmdrüse, Kieme und Schwanzmuskel den Hauptanteil an der Kupfermenge der Organe. Sie sind zugleich auch die größten Organe des Flußkrebse. Die höchsten Kupferkonzentrationen werden dagegen von Mitteldarmdrüse, Bauchmark und Hämolymphe erreicht. Die Mitteldarmdrüse der Krebse ist für beide Geschlechter das Organ, welches mit großem Abstand zu allen anderen Organen die höchsten Kupfermengen und Kupferkonzentrationen aufweist. Sie dürfte im Kupferstoffwechsel der Krebse eine besondere Rolle spielen und ist sicherlich das Hauptspeicherorgan für Kupfer. Spätere Untersuchungen des Verhältnisses von "freiem" zu gebundenem Kupfer und die Frage nach kupferproteiden richten sich daher mit besonderem Interesse auf die Mitteldarmdrüse.

2) Geschlechtsunterschiede

Die Jahresmittel der Kupferkonzentrationen (Tab.4) zeigen mit Ausnahme von Mitteldarmdrüse, Mandibelmuskeln, Schwanzmuskel und Bauchmark für die übrigen Organe der Flußkrebse statistisch gesicherte ($P < 0,05$) Geschlechtsunterschiede. Gesamtkupferkonzentration und Gesamtkupfermenge der Organe weisen im Jahresmittel auf einen höheren Kupferspiegel der Weibchen.

Tab. 4 Jahresmittel der Kupfermengen ($\mu\text{g Cu/Organ}$) und Kupferkonzentrationen ($\mu\text{g Cu/g Organ Trockengewicht}$) des Flußkrebsses. Sicherung von Geschlechtsunterschieden mit $P < 0,05$. Die Kupfer-Mengen sind Mittel aus Tieren unterschiedlicher Größe und können nur wegen der im Jahresmittel etwa gleichen Körpergewichte ($\sigma = 25 \text{ g}$, $\text{q} = 23 \text{ g}$) verglichen werden. (n)

Organ	Mittlere Cu-Menge		Mittlere Kupferkonzentration			
	σ	q	$\emptyset$	σ	q	$P \sigma : \text{q}$
Antennen- drüsen	2 (57)	3 (57)	396	227 ± 102 (56)	564 ± 188 (57)	$= 0,0003$
Mitteldarm- drüse	113 (54)	112 (53)	2283	2284 ± 493 (54)	2282 ± 609 (53)	$> 0,05$
Herz	4 (56)	3 (55)	806	767 ± 266 (54)	845 ± 212 (54)	$< 0,02$
Mandibel- muskeln	6 (55)	5 (53)	485	459 ± 123 (55)	521 ± 205 (53)	$> 0,05$
Kieme	13 (59)	17 (60)	529	472 ± 34 (58)	586 ± 50 (59)	$< 0,0002$
Enddarm	5 (55)	4 (53)	968	1052 ± 158 (54)	883 ± 185 (53)	$< 0,0002$
Magen	6 (56)	5 (56)	304	314 ± 60 (56)	293 ± 59 (56)	$< 0,0002$
Schwanz- muskel	11 (50)	13 (51)	56	56 ± 25 (49)	55 ± 7 (51)	$> 0,05$
Vas deferens	3 (55)		799	799 ± 273 (54)		
Ovar		8 (50)	445		445 ± 254 (48)	
Bauch- mark	2 (50)	2 (51)	1432	1407 ± 145 (48)	1456 ± 122 (48)	$> 0,05$
Hämo- lymphe			1442	1187 ± 256 (28)	1697 ± 530 (46)	$< 0,0002$
Carapax			21	23 ± 7 (50)	18 ± 7 (55)	$= 0,01$
Summe	165	172				

Die Abbildungen 4, 5 und 6 lokalisieren Geschlechtsunterschiede in den verschiedenen Monaten des Jahres (s. Pfeile zwischen den Kurven) für die mittlere Kupferkonzentration der Krebsorgane (S. 23), für die Kupferkonzentration der einzelnen Organe (S. 24 - 26) und den prozentualen Anteil einiger Organe an der Gesamtkupfermenge der Organe (S. 29). Nach Abbildung 5 zeigen die Kupferkonzentrationen aller Organe zu verschiedenen Zeiten des Jahres signifikante Geschlechtsdifferenzen, die ganz allgemein durch eine unterschiedliche physiologische Situation der Geschlechter zu erklären sind. Die statistischen Signifikanzen bei Mandibelmuskeln und Schwanzmuskel bleiben dagegen unverständlich. Der Gesamtkupferspiegel der Organe (Abb. 4) weist auf eine Konzentration der Geschlechtsunterschiede in der Zeit von Januar bis April (Wassertemperaturen der Havel unterhalb 10° C). Man wird diese auf eine unterschiedliche Vorbereitung beider Geschlechter auf die Sommermonate, mit Wassertemperaturen oberhalb 10° C, zurückführen dürfen, die u.a. durch Eiablage und Kopulation in besonderer Weise gekennzeichnet werden. Hierfür sprechen auch die in Abbildung 5 (S. 25) zeitlich klar voneinander unterschiedenen Kupferkonzentrationsverhältnisse in Vas deferens und Ovar. Es ist denkbar, daß die Einheit im Gesamtkupferspiegel (Abb. 4) beider Geschlechter von Mai bis Juli auf den Einfluß der in dieser Zeit einsetzenden Häutung zurück geht, von dem Männchen und Weibchen gleichermaßen betroffen werden.

Man darf zusammenfassend feststellen, daß die physiologischen Unterschiede der Geschlechter auch den Kupferspiegel der Krebse beeinflussen und signifikante Geschlechtsunterschiede determinieren.

3) Jahreszeitliche Veränderungen des Kupferspiegels

Die nachfolgende Abbildung 4 zeigt zunächst den jahreszeitlichen Verlauf der mittleren Kupferkonzentration der Organe für beide Geschlechter. Die Darstellung ist kombiniert mit einer Kurve des jahreszeitlichen Temperaturverlaufs im Havelwasser nach Angaben der Berliner Wetterkarte (gemessen vor Lindwerda, in 1 m Tiefe um 12 Uhr).

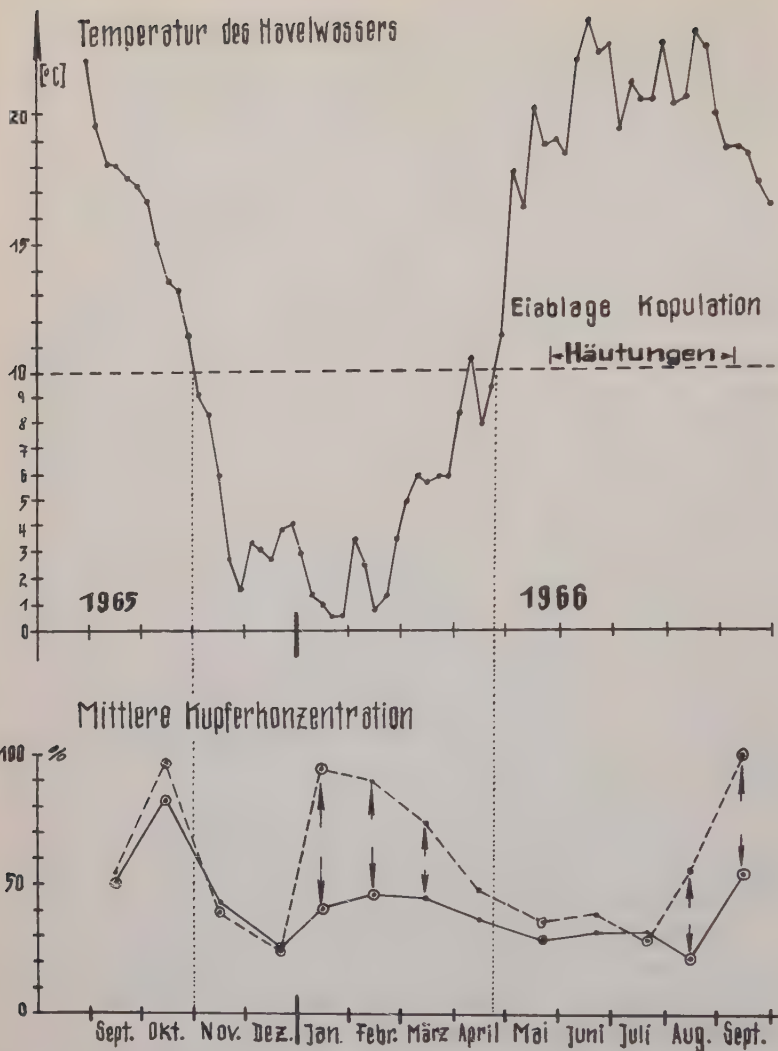


Abb. 4 Mittlere Kupferkonzentration der Organe (ausgenommen Hämolymphe, Hypodermis, Carapax, "Restkrebse") im Jahresverlauf, kombiniert mit einer Temperaturkurve des Havelwassers vor Lindwerda (1 m T., 12 h). 100 % entsprechen 870 μg Cu/g Organtrockengewicht. Geschlechtsunterschiede (s. Pfeile) zwischen männl. (—) und weibl. (---) Krebsen sind durch folgende P-Werte gesichert: Januar und Februar $< 0,0002$, März 0,02, August 0,01 und September $< 0,0002$. Signifikant unterschiedene Punkte innerhalb der Kurven wurden eingekreist (O) und gelten für $P < 0,05$

Beide Geschlechter zeigen einen zweigipfligen Kurvenverlauf ihrer mittleren Kupferkonzentration, der mit einem $P < 0,05$ gesichert werden konnte (s. eingekreiste Kurvenpunkte). Im Blick auf die für die Jahresrhythmik der Flußkrebse wichtige 10^0 - Grenze der Wassertemperatur beobachtet man mit ihrem Unterschreiten (Nov. 1965) ein starkes Absinken der mittleren Kupferkonzentration der Organe. Ein nachfolgender Konzentrationsgipfel (Jan./Febr. 1966) wird noch vor Eintritt in die für die Flußkrebse besonders aktive Jahreszeit, mit Wassertemperaturen oberhalb 10^0 C, wieder abgetragen. In den Monaten Mai, Juni, Juli und August, die bei den Krebsen wesentlich unter dem Einfluß von Eiablage, Kopulation und Häutung stehen, liegt ein breites Konzentrationsminimum, und man wird diesen Kupferverlust im Zusammenhang mit jenen Prozessen zu sehen haben. Erst am Ende der Häutungszeit (Aug./Sept.) kommt es zu einer deutlichen Zunahme der mittleren Kupferkonzentration und dem zweiten Jahresgipfel.

Die jahreszeitlichen Änderungen der Kupferkonzentration, wie sie Abbildung 4 aufzeigt, bezeichnen zugleich auch die Veränderungen der mittleren Kupfermengen der Organe im Jahresverlauf. Jahreszeitliche Änderungen des Trockengewichts der Organe sind ohne Einfluß auf die Kurventendenz der Kupferkonzentration. Wie aus einer Jahresbeobachtung des prozentualen Trockengewichtsanteiles der Mitteldarmdrüse an ihrem Frischgewicht abzuleiten ist, wird der Kupferkonzentrationsgipfel im Januar/Februar durch verringerte Trockengewichte unterstützt. Eine Steigerung des prozentualen Trockengewichtsanteiles schwächt dagegen im Nachhäutungs-gipfel der Kupferkonzentration den Wert der zugrunde liegenden Erhöhung der Kupfermenge ab. Es kommt in der Nachhäutungszeit, also neben einer aktiven Nahrungsaufnahme, auch zu einer gesteigerten Aufnahme von Kupfer.

Abbildung 5 (S. 24 - 26) zeigt nun die jahreszeitlichen Änderungen in den Kupferkonzentrationen der einzelnen Organe. Auch hier wird durch Einkreisen signifi-

Abb. 5

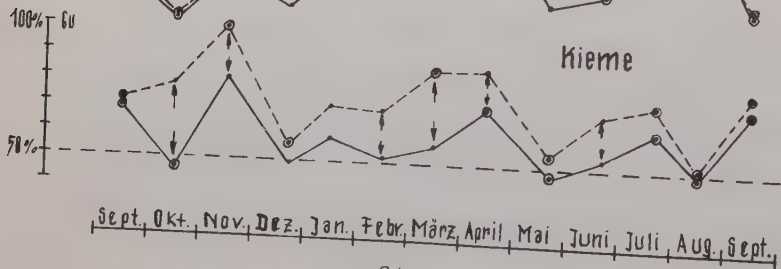
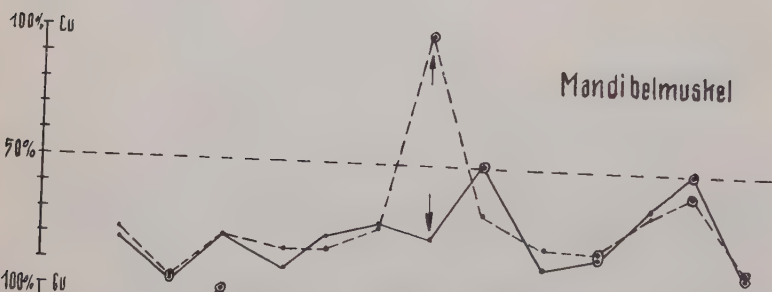
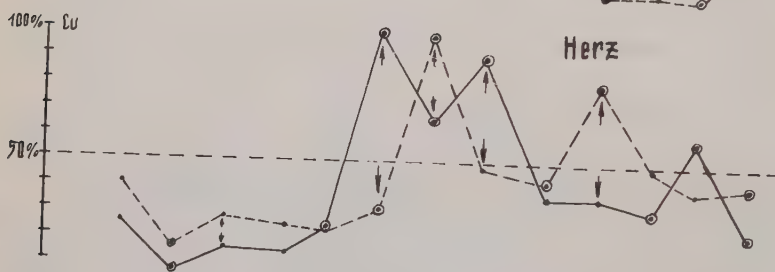
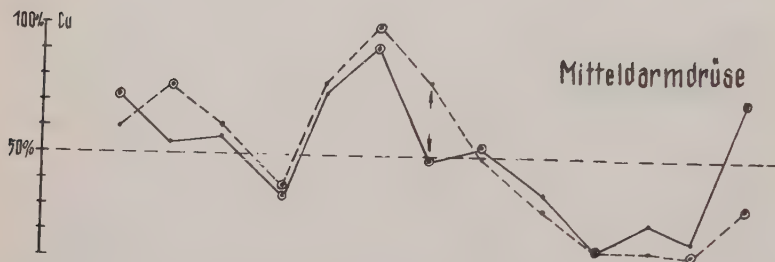
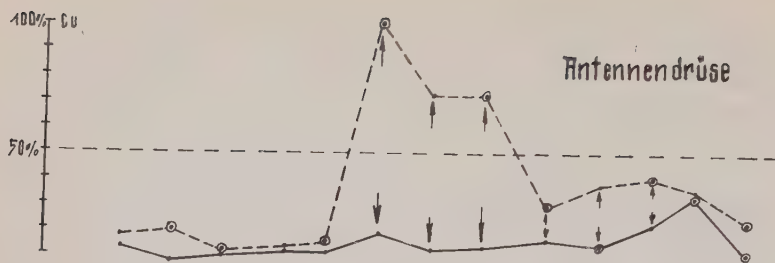
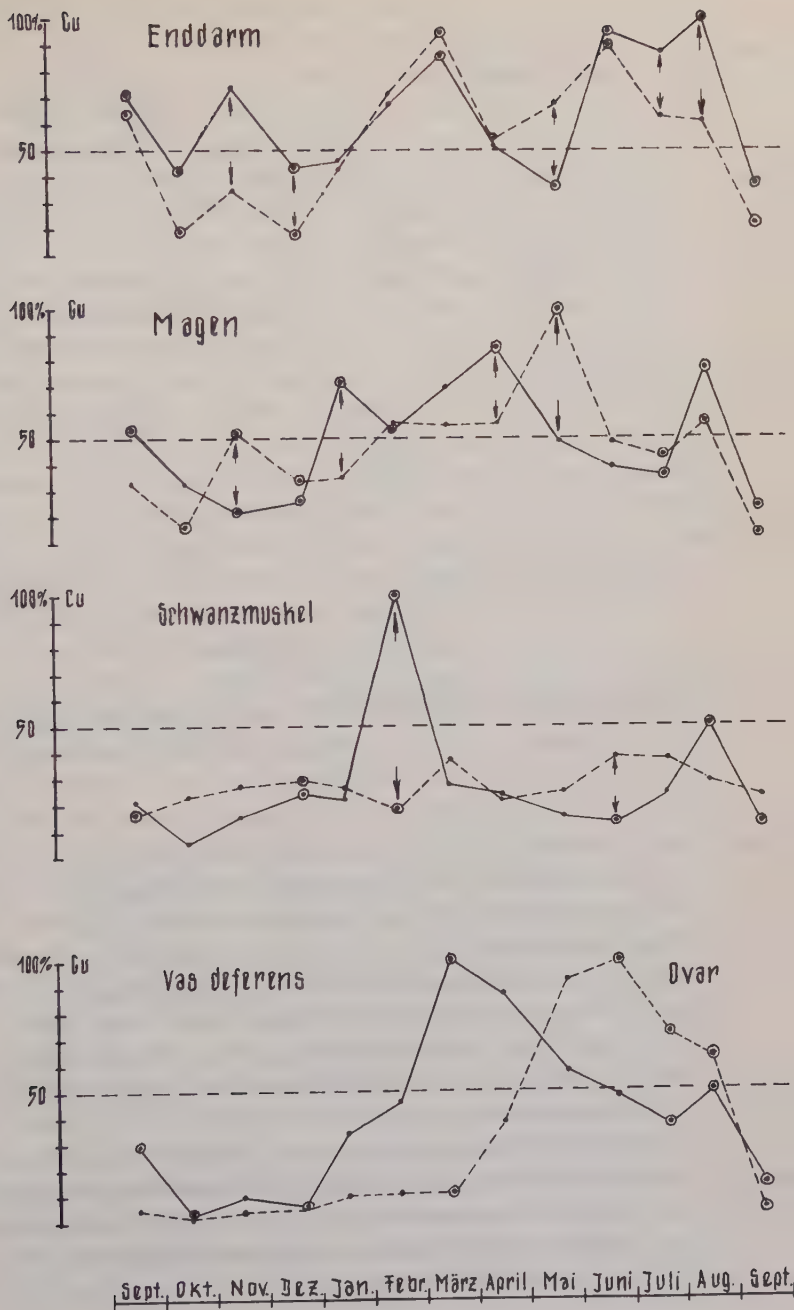


Abb. 5



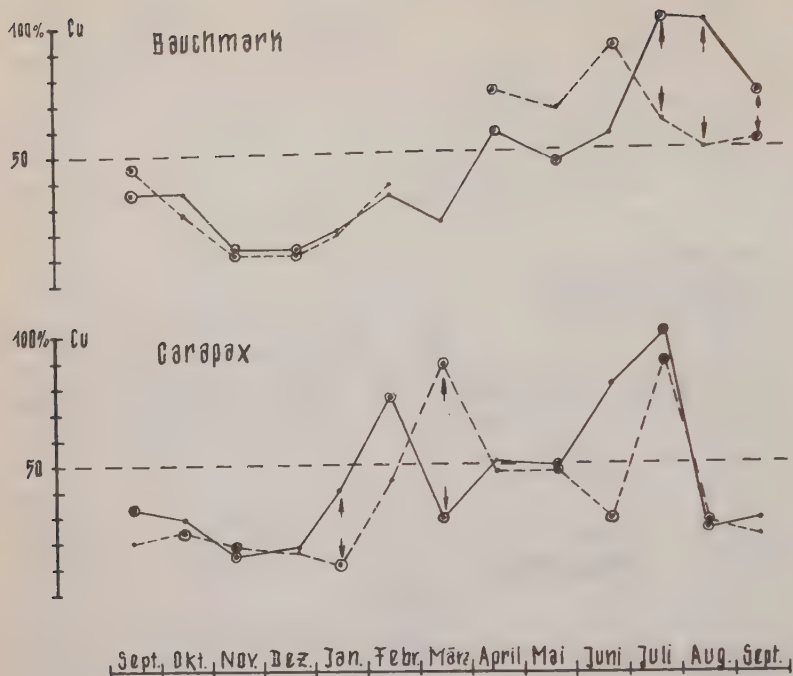


Abb. 5 Kupferkonzentration der Organe männlicher (—) und weiblicher (----) Flußkrebse im Verlaufe eines Jahres. 100 % entsprechen den folgenden Kupferkonzentrationen der Organe, angegeben in $\mu\text{g Cu/g}$ Organtrockengewicht : Antennendrüsen 1456, Mitteldarmdrüse 4538, Herz 1931, Mandibelmuskeln 1913, Kieme 801, Enddarm 1634, Magen 638, Schwanzmuskel 205, Vas deferens 1991, Ovar 1387, Bauchmark 3194 und Carapax 55.

Statistisch gegeneinander abgesicherte Punkte werden innerhalb einer Kurve eingekreist und sind zwischen den Geschlechtern durch Pfeile markiert. Sie gelten für ein $P < 0,05$ bei (n) maximal 5.

kant unterschiedener Punkte ($P < 0,05$) auf die statistische Sicherung des Kurvenverlaufes hingewiesen.

Man beobachtet bei verschiedenen Einzelkurven (Mitteldarmdrüse ♂, ♀; Mandibelmuskeln ♂, ♀; Herz ♂; Magen ♂; Schwanzmuskel ♂) einen bereits in Abbildung 4 sichtbaren zweigipfligen Kurvenverlauf. Ganz im Gegensatz zu der dortigen Kurventendenz mit einem Gipfel weit vor bzw. unmittelbar nach der Häutungszeit erreichen die Antennendrüsen der Weibchen, Ovar, Bauchmark und Carapax ihr Jahresmaximum direkt zur Häutungszeit. Während die Antennendrüsen der Weibchen ein weites Maximum in der Vorhäutungszeit aufweisen, erreichen die der Männchen ihr Jahresmaximum im Häutungsmonat August. Wieweit nun hohe Kupferwerte in den Antennendrüsen für eine Kupferabgabe oder die Beteiligung an bestimmten Reaktionen in diesem Organ sprechen, kann hier nicht entschieden werden. Es ist ebenso möglich, daß der Abbau des Kupferspiegels in den Antennendrüsen der Weibchen mit dem zu vermutenden gleichzeitigen Kupferbedarf des Ovars in der Zeit von Mai bis August zusammenhängt.

Bei der Mitteldarmdrüse, die wegen ihrer hohen Kupfermenge und Kupferkonzentration als das Hauptspeicherorgan der Flußkrebse für Kupfer anzusehen ist, zeigen beide Geschlechter einen Kurvenverlauf, der der mittleren Kupferkonzentration der Organe, wie sie in Abbildung 4 dargestellt und diskutiert wurde, auffällig ähnlich ist. Dies findet seine Erklärung darin, daß der prozentuale Anteil der Mitteldarmdrüse an der mittleren Kupferkonzentration der Organe besonders hoch ist und daher den Kurvenverlauf wesentlich bestimmt. Die Mitteldarmdrüse erreicht also zur Zeit der Eiablage, Kopulation und Häutung ein Kupferminimum, das man, im Blick auf die Speicherfunktion, auf einen in dieser Zeit erhöhten Kupferbedarf bei Synthesen von Kupferverbindungen und der Katalyse enzymatischer Prozesse zurückführen könnte. Die jahreszeitlichen Änderungen des prozentualen Trockengewichtanteiles am Frischgewicht der Mitteldarmdrüse haben einen maximalen Anteil an den Änderungen der Kupferkonzentration ($\mu\text{g Cu/g Organ-trockengewicht}$) von 12 %, indem sie den Vorhäutungsgipfel

im Februar durch Trockengewichtsverlust erhöhen, während sie den Nachhäutungsgipfel bei gleichzeitigem Trockengewichtsanstieg in seiner Aussage über die eigentlichen Änderungen der Kupfermenge ($\mu\text{g Cu/Organ}$) abschwächen. Es kommt also nach der Häutungszeit zu einer intensiven Nahrungsaufnahme und Einlagerung von Kupfer in die Mitteldarmdrüse.

Eine spezielle Deutung des Kurvenverlaufs von Herz, Mandibelmuskeln, Kieme, Enddarm, Magen und Schwanzmuskel fällt schwer. Er muß unter dem allgemein beherrschenden Einfluß der Jahresrhythmik gesehen werden. Die markanten Gipfel der weiblichen Mandibelmuskeln im März und des männlichen Schwanzmuskels im Februar bleiben hingegen absolut unverständlich.

Auffällig sind die Unterschiede zwischen Vas deferens und Ovar. Das Vas deferens erreicht sein Kupfermaximum im März, noch vor Eintritt in die aktive Sommerzeit, während das Ovar ein ausgedehntes Kupfermaximum gerade von April bis August zeigt. Dies spricht für einen unmittelbaren Zusammenhang der Kupferkonzentration mit den Prozessen von Eiablage, Kopulation und Häutung. Auch der zu dieser Zeit steigende Kupferspiegel des Bauchmarks beider Geschlechter kann nur mit einer erhöhten regulatorischen Funktion des Nervensystems beim Ablauf jener für den Organismus einschneidenden Prozesse gesehen werden.

Auch die nachfolgende Abbildung 6 (S. 29) zeigt eine deutliche Jahresrhythmik der Organe, wenn man, wie hier geschehen, den prozentualen Anteil einzelner Organe an der Gesamtmenge des Kupfers aller Organe verfolgt. Die Mitteldarmdrüse trägt den prozentualen Hauptanteil an der Gesamtkupfermenge und zeigt einen deutlichen Zusammenhang zum Kurvenverlauf anderer Organe. Auch hier wird ein zweigipfliger Kurvenverlauf der Mitteldarmdrüse beobachtet, der bei den Weibchen zwei besonders markante Minima im Dezember und April erreicht, die durch Erhöhungen des Anteiles von Kieme und Ovar weitgehend aufgefangen werden. Einen erheblichen Anteil an der Gesamtkupfermenge hat der Schwanzmuskel, welcher für beide Geschlechter von Mai bis August eine stetige Zunahme aufweist.

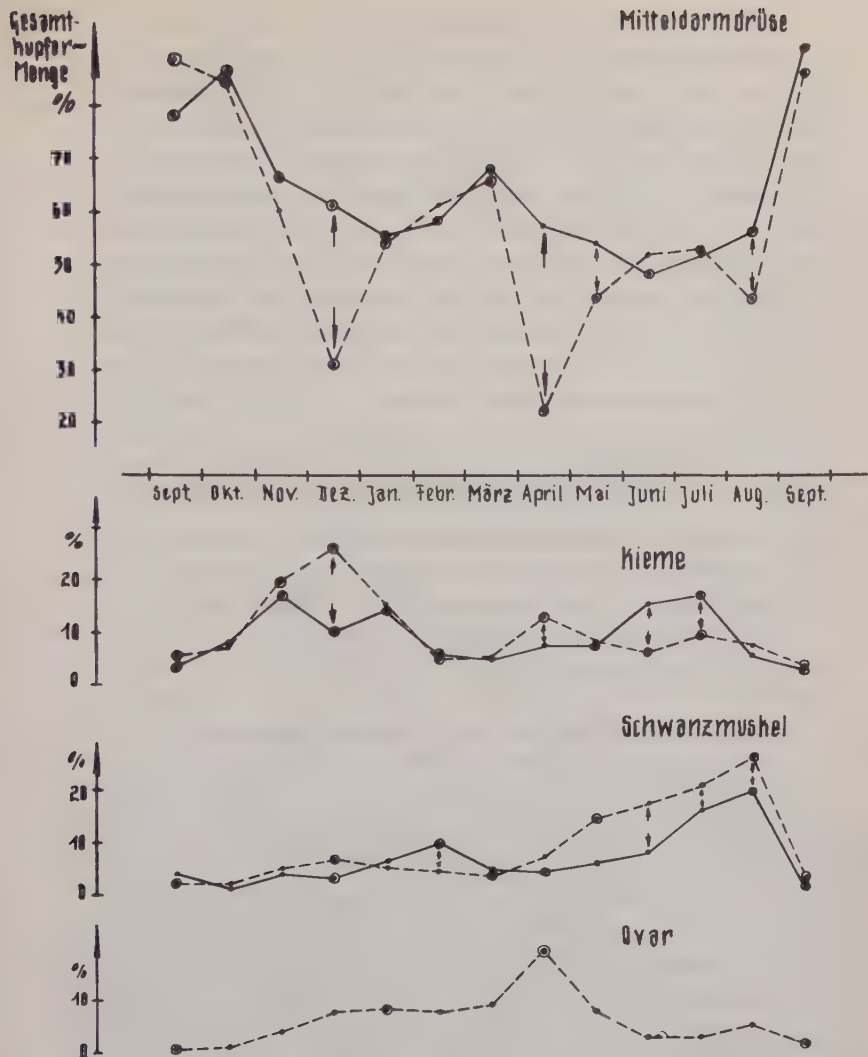


Abb. 6 Prozentualer Anteil einiger Organe an der Gesamtkupfermenge der Organe (ausgenommen Hämolymphe, Hypodermis, Carapax und "Restkrebse") im Jahresverlauf. Männliche Tiere ———, weibliche Tiere - - - - -

Zusammenfassend ist zu sagen, daß die jahreszeitlichen Veränderungen des Kupferspiegels der Organe, wie sie in den mittleren Kupferkonzentrationen der Organe, den Konzentrationen einzelner Organe und in deren prozentualen Anteilen an der Gesamtkupfermenge ihren Ausdruck finden, auffällige Beziehungen zur Jahresrhythmik im Leben der Flußkrebse zeigen, die u.a. durch den jahreszeitlichen Temperaturverlauf, hier des Havelwassers, stimuliert wird und in den besonderen Ereignissen von Eiablage, Kopulation und Häutung ihren Ausdruck findet.

4) Veränderungen zur Zeit der Häutung

Die nachfolgende Tabelle 6 zeigt den Einfluß der Häutung auf den Kupferspiegel der Organe.

Tab. 6 Vergleich der Kupferkonzentrationen ($\mu\text{g Cu/g}$ Organ Trockengewicht) in den Organen frischgehäuteter Krebse (Stadium B, 2 - 3 Tage nach der Häutung) mit ungehäuteten Krebsen des gleichen Monats.

Organ	Ungehäutet	2-3 Tage n.Häutung	P
	August	August	
Antennendrüsen	509 $\pm$ 181 (9)	194 $\pm$ 50 (7)	0,0002
Mitteldarmdrüse	780 $\pm$ 251 (8)	2165 $\pm$ 520 (7)	0,05
Herz	998 $\pm$ 159 (9)	427 $\pm$ 206 (7)	> 0,05
Mandibelmuskeln	849 $\pm$ 252 (9)	183 $\pm$ 77 (8)	0,028
Kieme	399 $\pm$ 124 (10)	279 $\pm$ 47 (8)	> 0,05
Enddarm	1316 $\pm$ 427 (10)	545 $\pm$ 58 (7)	0,013
Magen	433 $\pm$ 139 (9)	254 $\pm$ 95 (7)	> 0,05
Schwanzmuskel	80 $\pm$ 24 (9)	47 $\pm$ 15 (6)	0,008
Vas deferens	1991 $\pm$ 202 (4)	1028 $\pm$ 111 (4)	> 0,05
Ovar	870 $\pm$ 261 (4)	566 $\pm$ 86 (4)	> 0,05
Bauchmark	2388 $\pm$ 531 (8)	882 $\pm$ 142 (7)	0,03
Hämolymph	1202 $\pm$ 96 (9)	744 $\pm$ 122 (2)	0,0002
Carapax	14 $\pm$ 4 (10)	40 $\pm$ 12 (8)	0,005
Hypodermis		326 $\pm$ 40 (3)	

Als einzige Organe frisch gehäuteter Flußkrebse (Stadium B, Carapax noch ganz weich) erreichen Mitteldarmdrüse und neuer Carapax eine signifikante Erhöhung der Kupferkonzentration gegenüber ungehäuteten Vergleichstieren. Die übrigen Organe weisen kurz nach der Häutung einen erniedrigten Kupferspiegel auf. Es ist anzunehmen, daß der in den Jahreskurven der Abbildung 5 während der Haupthäutungsmonate beobachteten Abnahme der Kupferkonzentration in der Mitteldarmdrüse dann unmittelbar nach der Häutung, also im Stadium B, eine umgehende Erhöhung durch aktive Kupferaufnahme folgt. Die signifikante Erhöhung der Kupferkonzentration des neuen Carapax geht zu 40 % auf den verringerten Anteil des Trockengewichtes im noch weichen Carapax zurück. 60 % der Konzentrationssteigerung gehen dagegen auf eine Erhöhung der Kupfermenge zurück, was dafür sprechen mag, daß im Gefolge des Erhärtens in den neuen Carapax neben anderen Substanzen auch Kupfer eingelagert wird. Auffällig ist auch der erniedrigte Kupferspiegel der Hämolymphe bei frisch gehäuteten Krebsen. Es ist denkbar, daß in der weichen Phase der Häutung Sauerstoff in größerem Maße über die Körperoberfläche aufgenommen werden kann und daher geringere Anforderungen an die Sauerstofftransportleistung der Hämolymphe gestellt werden. Dies würde einen geringeren Kupferspiegel der Hämolymphe rechtfertigen. Erst mit der Verfestigung des neuen Carapax hätte eine Kupfererhöhung in der Hämolymphe zu erfolgen. Sie könnte durch aktive Kupferaufnahme erreicht werden, wie sie bereits nach Befunden an der Mitteldarmdrüse vermutet wurde. Man kann zusammenfassend feststellen, daß die Häutung einen deutlichen Einfluß auf den Kupferspiegel der Organe des Flußkrebse ausübt.

2. Experimentelle Beeinflussung des Kupferspiegels

Die nachfolgenden Haltungsexperimente galten der Frage, ob der Kupferspiegel der Organe beeinflussbar ist und wie weit abnorme Kupferangebote auf den Flußkrebs letal wirken. Die Haltungsversuche erstreckten sich über einen Zeitraum von 56 Tagen (Mai - Juli 1966) , während die Toxizitätsversuche beendet wurden, nachdem in einem der zu vergleichenden Ansätze 100 % der Tiere den vorgegebenen Bedingungen erlegen waren. Während der Haltungsexperimente mußten die Versuchstiere hungern, um Einflüsse der Nahrung auszuschließen. Es wurde daher der Einfluß zweimonatigen Hungerns auf die Kupferkonzentration der Organe selbst getestet und den eigentlichen Haltungsbedingungen als Vergleichsgruppe gegenübergestellt. Eine "Normalhaltung" in Leitungswasser, bei ständiger Frischluftzufuhr und Fütterung mit Rinderherz, zeitigte keine Unterschiede der Kupferkonzentration im Vergleich zu Freiwassertieren des gleichen Zeitpunktes.

5) Haltung in deionisiertem Wasser und Hunger

In drei parallelen Versuchsansätzen mußten Krebse 2 Monate in Leitungswasser und in deionisiertem Wasser hungern, während eine dritte Gruppe während ihres Aufenthaltes in deionisiertem Wasser regelmäßig mit Rinderherz gefüttert wurde. Um das deionisierte Wasser rein zu erhalten, wurde das Wasser täglich erneuert. Die Fütterung der Tiere fand dreitägig für 5 Stunden in einem separaten Becken mit deionisiertem Wasser statt, in welches kleine Stücken von Rinderherz eingebracht wurden.

Tabelle 7 (S. 33) zeigt den Einfluß der geschilderten Haltungsbedingungen auf die Kupferkonzentration der Organe. Statistisch gesicherte Abweichungen der Haltungstiere gegenüber Frischfängen des gleichen Monats werden in der Tabelle durch Sternchen * angezeigt und gelten für ein $P < 0,05$.

Zweimonatiges Hungern in Leitungswasser führt, wie in deionisiertem Wasser, zu einer allgemeinen Erhöhung der Kupferkonzentration in den Organen. Deionisiertes Wasser bewirkt gegenüber Hunger in Leitungswasser z.T. noch ausgeprägtere Konzentrationserhöhungen und die zu-

Tab.7 Einfluß verschiedener Haltungsbedingungen auf die Kupferkonzentration der Organe ($\mu\text{g Cu/g Organ-trockengewicht}$). Mittel aus beiden Geschlechtern. Unterschiede zu Frischfängen werden durch Sternchen * gekennzeichnet und sind durch ein $P < 0,05$ statistisch gesichert. Die genauen P-Werte werden auf Seite 34 unten angegeben

O r g a n	Frischfang Juli 1966	Hungern in Leitungsw. Mai-Juli	Hungern in deionisiertem Wasser Mai-Juli	Fütterung Mai-Juli
Antennendrüsen	465 ± 135 (9)	431 ± 119 (9)	547 ± 189 (9)	345 ± 121 (10)
Mitteldarmdrüse	931 ± 337 (8)	2419* ± 254 (9)	3858* ± 915 (5)	776 ± 143 (8)
Herz	783 ± 343 (10)	1096 ± 190 (9)	1588* ± 327 (7)	892 ± 355 (9)
Mandibelmuskeln	646 ± 257 (8)	518 ± 188 (10)	470 ± 110 (10)	575 ± 134 (9)
Kiemen	560 ± 105 (10)	513 ± 119 (10)	569 ± 124 (10)	546 ± 122 (10)
Enddarm	1208 ± 423 (9)	1678* ± 408 (9)	2601* ± 457 (9)	1980* ± 578 (10)
Magen	253 ± 78 (10)	312 ± 88 (10)	489 ± 136 (10)	496* ± 95 (9)
Schwanzmuskel	63 ± 21 (10)	139* ± 28 (10)	110* ± 32 (9)	163* ± 42 (8)
Vas deferens	733 ± 145 (5)	901 ± 146 (2)	2026* ± 280 (3)	1416* ± 558 (4)
Ovar	999 ± 184 (4)	1388* ± 62 (3)	1173 ± 189 (4)	991 ± 252 (5)
Bauchmark	2570 ± 168 (9)	2640 ± 379 (8)	4347* ± 712 (6)	729 ± 219 (8)
Carapax	52 ± 18 (10)	26* ± 3 (10)	41 ± 11 (10)	22 ± 6 (9)
Hämolymphe	451 ± 107 (8)	2771* ± 568 (10)	1504* ± 388 (10)	968* ± 264 (9)
Hypodermis	543 ± 149 (6)	579 ± 172 (10)	597 ± 215 (10)	534 ± 124 (8)

sätzliche Sicherung des Haltungseinflusses auf Herz und Bauchmark. In deionisiertem Wasser regelmäßig gefütterte Krebse zeigen in 5 Organen ebenfalls signifikante Konzentrationserhöhungen und Einflüsse der besonderen Haltungsbedingungen gegenüber Normaltieren aus dem Freiwasser. Es ist hingegen bemerkenswert, daß der Kupferspiegel in der Mitteldarmdrüse im Gegensatz zu beiden Hungerhaltungen bei Fütterung in deionisiertem Wasser unverändert bleibt.

Was der unveränderte Kupferspiegel in der Mitteldarmdrüse bei Fütterung in deionisiertem Wasser bereits andeutete, wurde durch eine Betrachtung der Kupfermengen in den Organen bestätigt. Die Konzentrationserhöhungen des Kupfers in den Organen gehen, unabhängig vom Milieu, bei zweimonatigem Hunger auf einen Verlust der Bezugsbasis Trockengewicht zurück. Die Tiere mobilisieren in dieser Zeit körpereigene Substanzen zur Aufrechterhaltung der Lebensfunktionen und erleiden einen Trockengewichtsverlust. Hierbei werden vor allem Reservestoffe der Mitteldarmdrüse verbraucht, was hier, im Gegensatz zu gefütterten Tieren, die erheblichen Steigerungen der Kupferkonzentration bewirkt. Einige Tiere, die 2 Monate in deionisiertem Wasser hungerten, hatten ihre Mitteldarmdrüsen fast bis zur Unkenntlichkeit aufgezehrt.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß langzeitiges Hungern und der Aufenthalt in deionisiertem Wasser zwar die Kupferkonzentrationen der Organe verändern, die Kupfermenge in den Organen jedoch bleibt gleich.

Obwohl die vorgestellten Haltungsversuche zunächst auf den Kupferspiegel der Organe gerichtet waren, zeigte sich bereits in deionisiertem Wasser, wie auch bei den

Zu Tab. 7 (S. 33)

Statistische Sicherung von Unterschieden durch die folgenden P-Werte :

Hunger in Leitungswasser : Mitteldarmdrüse 0,05, Enddarm 0,04, Schwanzmuskel < 0,0002, Ovar 0,028, Carapax 0,029 und Hämolymphe 0,009
Hunger in deionisiertem Wasser : Mitteldarmdrüse < 0,0002, Herz 0,001, Enddarm < 0,0002, Schwanzmuskel 0,0027, Vas deferens < 0,0002, Hämolymphe 0,036, Bauchmark 0,0003
Fütterung in deionisiertem Wasser : Enddarm 0,03, Magen 0,0004, Schwanzmuskel 0,046, Vas deferens 0,05, Bauchmark, Hämolymphe und Carapax alle mit $P < 0,0002$

im nachfolgenden Abschnitt 6) zu beschreibenden Tierhaltungen in Kupfermedien von 40 und 100 µg Cu/ml Leitungswasser, eine auffällige Letalität, während das Hungern in gewöhnlichem Leitungswasser ohne Todesfolge blieb :

				Letalität n. 56 Tagen	
Haltung in Leitungswasser mit Fütterung				0	%
"	"	ohne	"	0	%
"	in deionisiert. H ₂ O mit	"	"	41	%
"	in	ohne	"	37	%
"	40 µg Cu/ml Leitgw. ohne	"	"	58	%
"	100 µg Cu/ml Leitgw. ohne	"	"	85	%

Da die besprochenen Haltungsversuche keine Änderungen der Kupfermengen in den Organen hervorriefen, muß aus der mit der Versuchsdauer steigenden Letalität in deionisiertem Wasser von 39 % (nach 56 Tagen) auf einen tödlich wirkenden Verlust anderer lebenswichtiger Ionen an das deionisierte Wasser geschlossen werden. Bestimmender Faktor der Letalität ist hier das Milieu, nicht der Ernährungszustand.

6) Kupfer im Außenmedium

In zwei parallelen Versuchsansätzen wurden Krebse in Leitungswasser mit einer Kupferkonzentration von 40 bzw. 100 µg Kupfer/ml zwei Monate ohne Fütterung gehalten. Tabelle 8 (S. 36) zeigt den Einfluß derartiger Kupfermedien auf die Kupferkonzentration der Organe im Vergleich zu Tieren, die in reinem Leitungswasser hungerten.

Die Befunde sprechen eindeutig für einen Einfluß der Kupfermedien auf die Kupferkonzentration der Organe. Signifikante Änderungen der Kupferkonzentration gehen hier ausschließlich auf Änderungen der Kupfermenge zurück, da für die ebenfalls hungernde Vergleichsgruppe die gleichen Trockengewichtsverluste gelten. Man beobachtet bei der Mehrzahl der Organe signifikante Erhöhungen des Kupferspiegels (s. Sternchen * in Tab. 8), die mit der Konzentration des Kupfermediums steigen. Kupfer gelangt also aus dem umgebenden Milieu in den Organismus.

Tab.8 Einfluß zweimonatigen Aufenthaltes in Kupfermedien auf die Kupferkonzentration der Organe ($\mu\text{g Cu/g}$ Organtrockengewicht). Mittel aus beiden Geschlechtern. Statistisch gesicherte Unterschiede gegenüber dem Aufenthalt in reinem Leitungswasser werden durch *, Unterschiede zwischen gestorbenen und überlebenden Krebsen durch $\otimes$ gekennzeichnet. Ihnen entsprechen folgende P-Werte :

Aufenthalt in $40 \mu\text{g Cu/ml}$ Leitungswasser : Mitteldarmdrüse $< 0,0002$, Kieme $0,018$, Enddarm $0,05$, Bauchmark $0,017$, Hämolymphe $< 0,0002$, Carapax $0,019$

Aufenthalt in $100 \mu\text{g Cu/ml}$ Leitungswasser : Mitteldarmdrüse $< 0,0002$, Herz $0,02$, Kieme $0,01$, Enddarm $0,04$, Magen $< 0,0002$, Vas deferens $0,011$, Hämolymphe $0,0002$, Carapax $0,0005$, Hypodermis $0,0008$

Gestorbene T. : Überlebende T. in $100 \mu\text{g Cu/ml}$: Mandibelmuskeln $< 0,0002$, Kieme $0,04$, Vas deferens $0,015$, Ovar ($0,02$), Bauchmark $0,037$

Organ	Hungern in Leitungsw.		Hungern in 40 µg Cu/ml		Hungern in 100 µg Cu/ml		Hungern in 100 µg Cu/ml	
	Mai-Juli		Mai-Juli		Mai-Juli		Mai-Juli	
	überlebende Tiere						gestorbene T.	
Antennendr.	431		337		536		735	
	± 119 (9)	±	69 (7)	±	132 (3)	±	229 (4)	±
Mitteldarmdr.	2419		5862 *		5895 *		4900	
	± 354 (9)	±	1511 (5)	±	854 (2)	±	969 (5)	±
Herz	1096		1287		2304 *		1153	
	± 190 (9)	±	346 (7)	±	623 (3)	±	547 (5)	±
Mandibelm.	518		291		589		222 ⊗	
	± 188 (10)	±	87 (7)	±	93 (3)	±	50 (5)	±
Kiemen	513		2922 *		7128 *		1368 ⊗	
	± 119 (10)	±	629 (7)	±	107 (3)	±	206 (4)	±
Enddarm	1678		2507 *		2744 *		2145	
	± 408 (9)	±	880 (7)	±	593 (2)	±	663 (5)	±
Magen	312		402		782 *		520	
	± 88 (10)	±	117 (7)	±	144 (3)	±	138 (5)	±
Schwanzmuskel	139		213		194		93	
	± 28 (10)	±	86 (6)	±	58 (3)	±	30 (5)	±
Vas deferens	901		2740		2936 *		876 ⊗	
	± 146 (2)	±	896 (3)	±	494 (2)	±	91 (2)	±
Ovar	1388		1672				710 ⊗	
	± 62 (3)	±	423 (3)			±	64 (4)	±
Bauchmark	2640		1741 *		2035		602 ⊗	
	± 379 (8)	±	474 (5)	±	746 (3)	±	154 (3)	±
Carapax	26		53 *		70 *		50	
	± 3 (10)	±	15 (5)	±	15 (3)	±	16 (5)	±
Hämolymphe	2771		1059 *		914 *			
	± 568 (10)	±	234 (7)	±	28 (3)			
Hypodermis	579		844		1280 *		915	
	± 172 (10)	±	218 (7)	±	102 (2)	±	190 (4)	±

Die extremen Kupfererhöhungen in der Kieme sind durch den innigen Kontakt der Kiemenoberfläche mit dem Außenmedium gut verständlich. Wahrscheinlich tritt Kupfer über die Kiemen in den Organismus ein, um auf dem Blutwege zu den Organen zu gelangen und hier die Erhöhungen in Mitteldarmdrüse, Herz, Enddarm, Magen, Vas deferens und Hypodermis auszulösen. Es bleibt allerdings unverständlich, weshalb gerade dann die Blutkupferkonzentration signifikante Erniedrigungen aufweist. Es fällt auf, daß bei allen Ansätzen der Kupferspiegel im Bauchmark signifikante Erniedrigungen erreicht. Dies könnte für einen besonderen Schutzmechanismus dieses wichtigen Organes gegen ungewöhnliche Kupferangebote sprechen. Die Kupferzunahmen im Carapax und der Hypodermis werden auf ein direktes Eindringen des Kupfers und Adsorption zurückgeführt werden müssen. Soviel zu Krebsen, die einen zweimonatigen Aufenthalt in Kupfermedien überlebt haben. Tiere dagegen, die innerhalb des Versuchszeitraumes starben, zeigen in den Organen, im Vergleich zu überlebenden Tieren, keine wesentlichen Abweichungen, die etwa auf den Wirkort der Toxizität des Kupfers schließen lassen. Die mit Ausnahme der Antennendrüsen in allen Organen angedeuteten erniedrigten Kupferkonzentrationen sind für Mandibelmuskeln, Kieme, Geschlechtsorgane und Bauchmark statistisch gesichert. Der niedrigere Kupferspiegel bei gestorbenen Krebsen könnte durch individuell geringere letale Dosen erklärt werden, bis zu deren Erreichen sich die Tiere durch Kupferausscheidung zu schützen versuchten. Hierfür könnten auch die in Antennendrüsen und Enddarm angedeuteten höheren Kupferkonzentrationen sprechen. Es bleibt unverständlich, weshalb Mandibelmuskeln und Bauchmark dieser im Kupfermedium gestorbenen Krebse sogar gegenüber Krebsen signifikante Kupfererniedrigungen aufweisen, die in reinem Leitungswasser gehalten wurden.

Zusammenfassend ist zu sagen, daß eine erhöhte Kupferkonzentration im Außenmedium auch einen Einfluß auf den Kupferspiegel der Organe des Flußkrebse ausübt,

dessen allgemeine Kupferzunahmen in den Organen von den Individuen verschieden gut vertragen werden.

Es wurde bereits im Abschnitt 5) berichtet, daß in den beiden hier beobachteten Kupfermedien (40 bzw. 100 µg Cu/ml Leitungswasser) die Letalität, steigend mit der Konzentration und der Zeit, nach 56 Tagen 58 % und 85 % erreichte. Es handelt sich bei diesen Kupferkonzentrationen um Bedingungen, die mit 40 µg Cu/ml etwa den Anteilen niedermolekularen ("freien") Kupfers im Blut und mit 100 µg Cu/ml denen der Gesamtkupferkonzentration im Milliliter Blut entsprechen. Es ist bemerkenswert, daß selbst solche den Blutverhältnissen vergleichbaren Kupferkonzentrationen, die freilich in der Natur nie vorkommen werden, von den Flußkrebsen so schlecht vertragen werden. Man darf annehmen, daß bei erweiterter Versuchsdauer auch die übrigen Krebse den ungewöhnlichen Kupferbedingungen erlegen wären.

Die nachfolgenden Versuche sollten nun die Frage beantworten, wie hoch für Flußkrebse, deren Atmungsmetall Kupfer ist, die toxische Dosis des Kupfers ist, um einen späteren Vergleich mit anderen Tieren zu ermöglichen. Für diese eigentlichen Toxizitätstests wurden Kupfermedien abnorm hoher Kupferkonzentrationen (150, 200, 250 und 300 µg Cu/ml Leitungswasser) gewählt und die tägliche Todesrate notiert. Alle Tiere kamen direkt aus der Havel und wurden den Versuchsgruppen nach zufälligen Zahlen zugeordnet, um für homogene Voraussetzungen zu sorgen. Die Versuche galten als abgeschlossen, wenn in einer der Versuchsgruppen alle Tiere gestorben waren. Diese Situation war nach 8 Versuchstagen erreicht :

Letalität nach 8 Tagen			
150 µg Cu/ml Leitungswasser, hungernd		4	%
200 µg Cu/ml	"	21	%
250 µg Cu/ml	"	57	%
300 µg Cu/ml	"	100	%

Die mittlere letale Dosis für Kupferaußenmedien, LD₅₀, konnte aus diesen Befunden mittels einer Probit-

Cu-Huftenmedien

Letalität in Abhängigkeit
von Konzentration und Zeit

Abb. 7

Zahl der
Toten

50

45

40

35

30

25

20

15

10

5

0

8.Tag

7.Tag

6.Tag

5.Tag

50% Tote

Regressionsverlauf

Z
berechnet

7

6

5

4

3

2

1

LD_{50}

Dosis

$\mu\text{g Cu/ml Außenmedium}$

150

200

250

300

150

200

250

300

Transformation berechnet werden :

$$LD_{50} = 230 \pm 9 \mu\text{g Cu/ml Au\ss enmedium (f\ddot{u}r P = 0,05)}$$

Abbildung 7 (S. 39) zeigt die Letalität in Kupfer-au\ss enmedien in Abhängigkeit von der Konzentration des Kupfers und der Zeit.

Ungewöhnlich hohe Kupferkonzentrationen im Lebensmedium der Flu\ss krebse erhöhen den Kupferspiegel der Organe und wirken letal. Die mittlere letale Dosis dieses Au\ss enkupfers liegt mit $230 \mu\text{g Cu/ml}$ Leitungswasser bei etwa der doppelten Blutkupferkonzentration der Flu\ss krebse.

7) Kupferinjektion in das Blut

Kupferinjektionen in das Blut (Herzgegend, Kupfersulfat in HARREVELD-Lösung), einer experimentellen Blutkupfererhöhung um 50, 75 und 100 % entsprechend (nach folgender Berechnung : Blutvolumen etwa 33 %, Kupfergehalt im Milliliter Blut $100 \mu\text{g}$; also z.B. $30 \text{ g Körpergewicht} \hat{=} 10 \text{ ml Blut} \hat{=} 1000 \mu\text{g Cu} \hat{=} 100 \%$), sollten Auskunft über den Einflu\ss derart verabreichten Kupfers auf die Lebensfähigkeit und den Kupferspiegel der Flu\ss krebse geben.

Die nachfolgende Aufstellung zeigt die Letalität nach Kupferinjektionen in das Blut innerhalb von 7 Versuchstagen bis zur Erreichung einer Sterbequote von 100 %. Auch hier kamen die Versuchstiere direkt aus der Havel und wurden den Versuchsgruppen nach zufälligen Zahlen zugeordnet :

Letalität nach 7 Tagen		
Injektion reiner HARREVELD-Lösung		0 %
Blutkupfererhöhung um etwa	50 %	70 %
"	75 %	81 %
"	100 %	100 %

Eine LD_{50} lie\ss sich aus dem Zahlenmaterial nicht berechnen, aber offensichtlich wirkt injiziertes Kupfer schneller und bei geringeren Dosen toxisch als im Au\ss enmedium dargebotenes Kupfer, welches zunächst in den Organismus eindringen m\ss te, um einen inneren Wirkort seiner Toxizität zu erreichen.

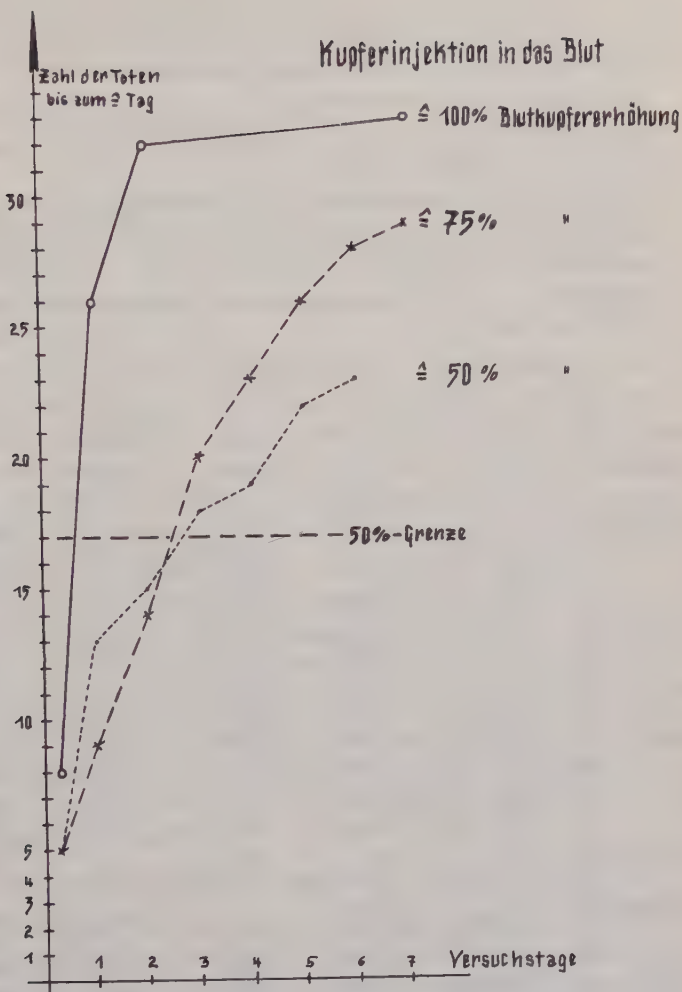


Abb. 8 Toxizität von Kupferinjektionen in das Blut
Darstellung der Letalität innerhalb von 7
Tagen

Tab.9 Einfluß injizierten Kupfers (Kupfersulfat-HARREVELD-Lösung) auf die Kupferkonzentration der Organe, im Vergleich zu Tieren nach Injektion reiner HARREVELD-Lösung. Angaben in $\mu\text{g Cu/g}$ Organtrockengewicht, Mittel aus beiden Geschlechtern, 4 Tage nach der Injektion. Unterschiede zur Vergleichsgruppe werden durch * , Unterschiede zwischen Überlebenden und gestorbenen Krebsen durch ⊗ gekennzeichnet und sind durch folgende P-Werte statistisch gesichert :

50 %-ige Blutkupfererhöhung : Antennendrüsen 0,04, Mitteldarmdrüse < 0,0002, Mandibelmuskeln 0,001, Enddarm 0,01, Magen 0,015, Vas deferens < 0,0002, Ovar 0,01, Bauchmark 0,0045

100 %-ige Blutkupfererhöhung : Antennendrüsen und Mitteldarmdrüse < 0,0002, Kieme 0,05, Enddarm 0,01, Magen 0,05, Vas deferens < 0,0002, Ovar 0,035, Bauchmark < 0,0002, Carapax 0,045

Gestorbene T. : Überlebende T. : Magen 0,008, Bauchmark < 0,0002

Organ	HARREVELD rein	Blutkupfererhöhung um			Tote n. Erhöhg.	
		50 %	75 %	100 %	50-100 %	
Antennendr.	358 ± 105(4)	777 * ± 87(3)	444 ± 3(2)	2056 * ± 39(4)	869 ± 130(5)	
Mitteldarmd.	581 ± 172(4)	2325 * ± 680(3)	1003 ± 368(2)	1414 * ± 58(4)	1153 ± 343(4)	
Herz	1341 ± 383(4)	1751 ± 566(4)	1633 ± 456(3)	1322 ± 243(4)	1409 ± 372(4)	
Mandibelm.	386 ± 117(4)	1305 * ± 175(4)	546 ± 206(2)	806 ± 17(4)	651 ± 118(5)	
Kiemen	507 ± 81(4)	669 ± 47(3)	364 ± 59(2)	1484 * ± 265(4)	680 ± 182(4)	
Enddarm	1166 ± 65(4)	1798 * ± 175(4)	1675 ± 199(2)	1695 * ± 78(4)	1719 ± 446(4)	
Magen	324 ± 79(4)	693 * ± 151(4)	464 ± 56(2)	705 * ± 146(4)	2490 ⊗ ± 279(4)	
Schwanzmusk.	110 ± 37(4)	148 ± 38(4)	89 ± 14(2)	52 ± 4(3)	146 ± 46(4)	
Vas deferens	1442 ± 54(4)	2574 * ± 136(4)		2842 * ± 171(4)	2526 ± 670(2)	
Ovar	1338 ± 69(2)	976 * ± 88(4)	976 ± 138(2)	1669 * ± 124(4)	685 ± 112(2)	
Bauchmark	2790 ± 130(4)	1753 * ± 339(4)	1926 * ± 105(2)	1629 * ± 107(4)	749 ⊗ ± 97(5)	
Hämolymphe	1145 ± 78(4)	1201 ± 94(3)	855 ± 80(2)	1013 ± 93(4)		
Carapax	16 ± 1(4)	26 ± 7(4)	10 ± 3(2)	40 * ± 14(4)	14 ± 2(3)	
Hypodermis	483 ± 113(4)	671 ± 105(4)	529 ± 64(2)	777 * ± 40(4)	613 ± 36(4)	

Abbildung 8 (S. 41) zeigt die Sterbequoten für experimentelle Blutkupfererhöhungen in Abhängigkeit von der Zeit. Tabelle 9 (S. 42) zeigt an einer parallelen Vergleichsgruppe den Einfluß injizierten Kupfers auf die Kupferkonzentration der Organe 4 Tage nach der Injektion.

Kupferinjektionen in das Blut der Krebse führen bei der Mehrzahl der Organe zu signifikanten Erhöhungen der Kupferkonzentration, verglichen mit Tieren nach Injektion reiner HARREVELD-Lösung (in der Tabelle durch Sternchen * gekennzeichnet). Herz, Schwanzmuskel und Hämolymphe weisen dagegen 4 Tage nach der Injektion unveränderte Kupferkonzentrationen auf, während das Bauchmark signifikant erniedrigt war. Die Erhöhungen des Kupferspiegels in Antennendrüsen, Kieme und Enddarm könnten für eine Ausscheidung gefährlich hoher Kupfermengen sprechen. Kupfererhöhungen in einigen anderen Organen, vor allem der Mitteldarmdrüse, lassen eine zeitweilige Speicherung des Kupfers vermuten. Dadurch könnte der Kupferspiegel schnellstens normalisiert werden, um eventuell das Bauchmark, welches bei Kupferinjektionen wie in Kupfermedien signifikante Erniedrigungen des Kupferspiegels aufwies, vor lebensgefährlichen Erhöhungen der Kupferkonzentration zu bewahren. Über den Wirkort der Toxizität des Kupfers ist allerdings auch nach dem Vergleich zwischen lebenden und gestorbenen Krebsen dieser Injektionsversuche keine Aussage zu machen.

8) Kupfergaben in den Magen

Obwohl in den Magen der Krebse wesentlich höhere Kupferdosen verabreicht wurden (den Blutberechnungen entsprechend 100, 200 und 400 %), zeigte sich in nicht einem Fall eine letale Wirkung derart dargebotenen Kupfers. Die Kupferlösungen wurden über eine Plastikkanüle mit einem Mikrometertrieb in genauer Dosis direkt in den Magen eingeführt, nachdem vorher der Magensaft mit einer Kapillare fast vollständig abgesogen wurde.

Erst nach einer derartigen Entleerung des Magens behalten die Krebse die Kupferlösungen bei sich.

Tabelle 10 (S. 45) zeigt den Einfluß über den Magen dargereichter abnormer Kupferangebote auf die Kupferkonzentration der Organe nach 5 Tagen. Auch diese Tiere kamen direkt aus der Havel und werden, 6 Tage nach dem Fang, mit Tieren des Freiwassers verglichen.

Die Versuchstiere zeigen signifikante Erhöhungen des Kupferspiegels in Mitteldarmdrüse, Enddarm, Vas deferens und Hypodermis. Die Erhöhungen in der Mitteldarmdrüse dürften für eine Speicherung des Kupferüberangebotes sprechen. Erhöhungen der Kupferkonzentration im Enddarm könnten auf eine Ausscheidung einer gefährlichen Überdosis toxischen Kupfers sprechen und böten eine Erklärung dafür, daß nach hohen Kupfergaben in den Magen der Flußkrebse keine Letalität beobachtet wurde (innerhalb von 56 Tagen). Wahrscheinlich trifft derartiges über den Magen aufgenommenes Kupfer auf einen intakten Sicherungsmechanismus, da es sich hier sicherlich um den natürlichen Weg der Kupferaufnahme mit der Nahrung handelt. Die Kupferzunahmen in Vas deferens und Hypodermis sind schwer zu bewerten. Vielleicht handelt es sich hier um Orte, an denen Kupfer zeitweilig deponiert werden kann, ohne toxisch zu wirken. Auch bei Überlebenden in Kupfermedien waren in diesen Organen signifikante Erhöhungen der Kupferkonzentration zu beobachten. Es bleibt dagegen völlig unverständlich, weshalb der Kupferspiegel in den Mandibelmuskeln und im Carapax nach Kupfer"fütterung" signifikant erniedrigt war.

Kupfergaben in den Magen der Flußkrebse beeinflussen also auch den Kupferspiegel der Organe, wirken aber selbst bei abnorm hohen Kupfergaben, die in der Natur freilich nie vorliegen, nicht letal, da sie wahrscheinlich durch Speicherung entgiftet oder ausgeschieden werden können.

Tab. 10 Einfluß in den Magen verabreichten Kupfers auf die Kupferkonzentration der Organe. Mittel aus beiden Geschlechtern, Angaben in $\mu\text{g Cu/g Organ-trockengewicht}$, Bestimmungen 5 Tage nach der Kupfergabe.

Signifikante Unterschiede zur Vergleichsgruppe werden durch * gekennzeichnet und sind durch die folgenden P-Werte statistisch gesichert :
 Mitteldarmdrüse $< 0,0002$, Mandibelmuskeln $0,05$,
 Enddarm $0,002$, Vas deferens $0,01$, Carapax $0,02$
 und Hypodermis $< 0,0002$

O r g a n	Frischfang Juli	Kupfergaben in d. Magen Juli
Antennendrüsen	465 ± 135 (9)	429 ± 100 (9)
Mitteldarmdrüse	931 ± 337 (8)	1794 ± 480 (9)*
Herz	783 ± 343 (10)	1126 ± 451 (7)
Mandibelmuskeln	646 ± 257 (8)	345 ± 98 (9)*
Kiemen	560 ± 105 (10)	676 ± 111 (9)
Enddarm	1208 ± 423 (9)	2888 ± 459 (8)*
Magen	253 ± 78 (10)	342 ± 82 (9)
Schwanzmuskel	63 ± 21 (10)	63 ± 20 (7)
Vas deferens	733 ± 145 (5)	1169 ± 319 (3)*
Ovar	999 ± 184 (4)	1002 ± 212 (4)
Bauchmark	2570 ± 968 (9)	3359 ± 766 (9)
Carapax	52 ± 18 (10)	26 ± 7 (8)*
Hypodermis	543 ± 149 (6)	813 ± 150 (9)*

Aus den Haltungsexperimenten ergibt sich nunmehr folgendes Bild : Kupfer gelangt aus dem umgebenden Milieu (Tab. 7) und mit der Nahrung (Tab. 10) über die Kiemen bzw. den Magen in den Organismus. Es erreicht über die Hämolymphe (Tab. 9) die Organe, um gespeichert oder wieder ausgeschieden zu werden. Ungewöhnliche Kupferangebote sind sicherlich von individuell unterschiedlicher Toxizität. Die Letalität nimmt in Abhängigkeit von der Kupferdosis und der Zeit ihres Einwirkens zu. Es ist denkbar, daß die Toxizität des Kupfers in erster Linie auf einer Störung enzymatischer Prozesse und der Beeinflussung von Membranprozessen (z.B. Störung der Kiemenpermeabilität) beruht. Ein genauer Wirkort der Toxizität des Kupfers ist nicht zu erkennen, wenn auch das Bauchmark in besonderer Weise gegen Änderungen der Kupferkonzentration gesichert scheint.

3. Das Verhältnis von "freiem" zu gebundenem Kupfer

9) Ergebnisse aus Fällungen, Dialysen, Filtrationen und Disc-Elektrophoresen von Blut und Mitteldarmdrüse

Man hat sich zu vergegenwärtigen, daß bereits die Tötung und Präparation das Gefüge funktioneller Ordnungen stören und Dissoziation des Kupfers aus den Eiweißkomplexen bewirken könnten, wodurch das hier zu untersuchende Verhältnis zugunsten des "freien" Kupfers verfälscht würde.

Es wurden daher Ergebnisse mit verschiedenen Verfahren ermittelt, unter denen den Befunden aus dem wohl schonendsten Experiment, der Druckfiltration, ein Aussagevorrang einzuräumen ist.

Verfahren	Anteil "freien" Kupfers in der Mitteldarmdrüse (n)		
Ammonsulfatfällung (75 % Sättigung)	32 %	± 3 %	(6)
Ultrafiltration	28 %	± 2 %	(2)
Langzeit-Dialyse (2-24 h, Durchfluß)	30 %	± 4 %	(5)
Kurzzeit-Dialyse (20 Minuten, Abb.1)	23 %	± 3 %	(6)
Disc-Elektrophorese (im Vorlauf)	25 %	± 2 %	(8)
Druckfiltration (Mai, Juni, Dez. 1966)	26 %	± 1 %	(8)

Verfahren	Anteil "freien" Kupfers in der Hämolymphe (n)
Disc-Elektrophorese (Nov.-Jan.)	40 % $\pm$ 2 % (4)
Druckfiltration (Mai, Juni, Dez. 1966)	38 % $\pm$ 1 % (6)

Die vorgestellten Ergebnisse sind selbstverständlich nur eine Aussage über die Anteile niedermolekularen Kupfers unter dem Einfluß des Experiments und können nur als obere Grenz-Werte der natürlichen Verhältnisse angesehen werden. Die Ergebnisse der Druckfiltrationen waren stets sehr gut reproduzierbar und ließen keine statistisch gesicherte Abhängigkeit von der Jahreszeit (Bestimmungen im Mai, Juni und Dezember 1966) erkennen. Das sogenannte "freie" Kupfer liegt ganz sicher in Bindung an Aminosäuren und eventuell kleine Peptide vor und ist nicht in der Form anorganischer Kupferionen zu denken. Man sollte daher besser von "niedermolekularem" Kupfer sprechen.

4. Kupferproteide

10) Präparative Darstellung des Hämocyanins und Apohämocyanins nach Gelfiltration des Blutes

Es wurde zunächst eine Gelfiltration mit Sephadex G-25 zur Isolation der Proteinfraction aus der Hämolymphe durchgeführt. Nach Einengung des Blutproteins, hier ausschließlich Hämocyanin, durch Gefriertrocknung, wurde durch Dialyse mittels KCN (n. KUBOWITZ 1938) Apohämocyanin dargestellt. Die hier ermittelten Kupfergehalte stimmen gut mit Literaturangaben für Crustaceen-Hämocyanine (0,16 - 0,19 % Cu) überein :

Hämocyanin = 0,16 % Kupfer $\pm$ 0,01 % (n = 3)

Apo-Hämocyanin = 0,12 % Kupfer $\pm$ 0,01 % (n = 3)

11) Kupferproteide in Hämolymphe und Mitteldarmdrüse

Die qualitative Elektrophorese ermöglichte die Anfärbung von 13 Proteinbanden in der Mitteldarmdrüse und zweier stets auftretender Eiweißbanden der Hämolymphe. Die Kupferfärbung mit Rubeanwasserstoff wies die beiden Blutproteinbanden und die Banden 1, 2, 7 und 12 der Mitteldarmdrüse als Kupferproteide aus. Die nachfolgende Abbildung 9 zeigt derartige Färbungen auf dem Gel unmittelbar nach der Elektrophorese.

Qualitative Disc-Elektrophorese

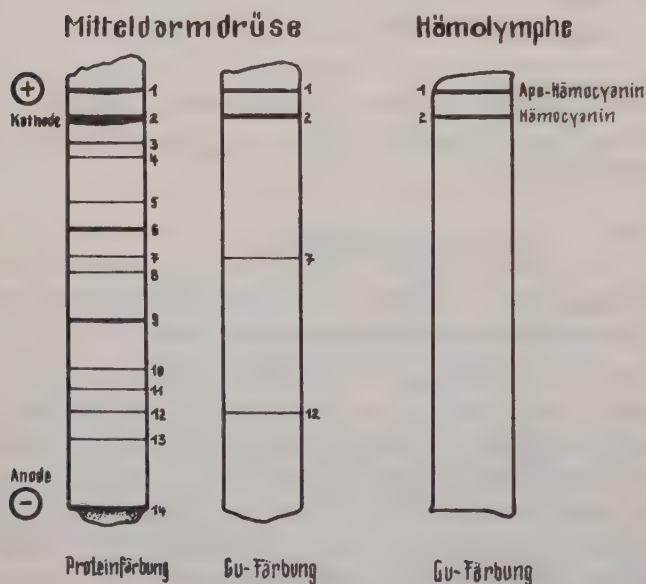


Abb. 9 Qualitative Disc-Elektrophorese der Blut- und Mitteldarmdrüsen-Proteine
Acrylamidgel, 200 V, 60 Min., Proteinfärbung mit Amidoschwarz B 10, Kupferfärbung mit Rubeanwasserstoff

Die Kupfer- und Proteinbestimmungen in den Eluaten der quantitativen Disc-Elektrophorese bestätigten die Existenz von 4 Kupferproteiden in der Mitteldarmdrüse (Bande 1, 2, 7, 12) und zweier Hämocyaninbanden im Blut. Abbildung 10 gibt die Elution von Kupferproteinfraktionen der Mitteldarmdrüse wieder.

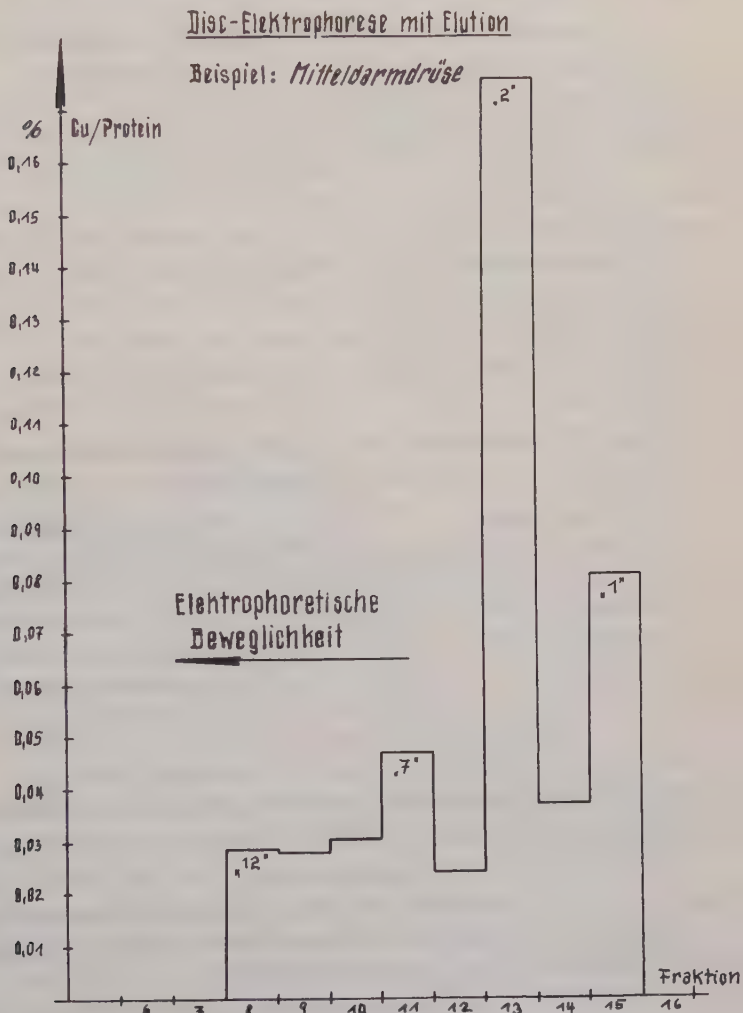


Abb. 10 Kupferproteide der Mitteldarmdrüse in den Fraktionen einer quantitativen Disc-Elektrophorese mit kontinuierlicher Elution Acrylamidgel, 200 V, 20° C, 2 h

Da bei der Elution der Mitteldarmdrüsen-Proteine das zuerst austretende Kupferprotein (vergleiche Bande 12 in Abb. 9) nicht so gut zu erkennen war wie die 3 anderen Kupferproteide, habe ich die Fraktion 8 in der Abbildung 10 mit diesem zuerst austretenden Kupferprotein gleichgesetzt.

Kupfergehalt und elektrophoretisches Verhalten (Mischelektrophoresen aus Blut und Mitteldarmdrüse führten jeweils zur Deckung der Banden 1 und 2) wiesen die Banden 1 und 2 der Mitteldarmdrüse und des Blutes als in Molekülgröße und Ladung ähnliche Kupferproteide aus, von denen Bande 2 als Hämocyanin und Bande 1 als dessen Apohämocyanin anzusehen sind. Die beiden anderen, kupferärmeren Proteide der Mitteldarmdrüse (Bande 7 und 12) fehlen der Hämolymphe (s. Abb. 9, S. 48). Es dürfte sich bei ihnen, nach dem elektrophoretischen Verhalten, um kleinere Moleküle und bzw. oder größere negative Ladung handeln.

Für die Kupferproteide in Blut und Mitteldarmdrüse wurden folgende Kupfergehalte bestimmt :

Hämolymphe			Mitteldarmdrüse
	Cu-Gehalt	Bande	Cu-Gehalt
Apo-Hämocyanin	0,075 % $\pm$ 0,002 (5)	1	0,081 % $\pm$ 0,002 (8)
Hämocyanin	0,174 % $\pm$ 0,003 (5)	2	0,176 % $\pm$ 0,003 (8)
		7	0,047 % $\pm$ 0,003 (8)
		12	0,029 % $\pm$ 0,002 (8)

Verteilung des Kupfers auf Proteide und niedermolekulare Anteile in Blut und Mitteldarmdrüse :

	Bande	Blut	Mitteldarmdrüse
Apo-Hämocyanin	1	22 %	8 %
Hämocyanin	2	40 %	16 %
	7	-	20 %
	12	-	31 %
"freies" Kupfer	Vorlauf	38 %	25 %

D i s k u s s i o n und vergleichende Betrachtung

1. Kupfergehalt der Tiere

1) Kupfergehalt der Tiere

Kupfergehalte ganzer Tiere wurden nur selten bestimmt. Ein Vergleich mit Isopoden zeigt, daß der Kupfergehalt von Orconectes limosus allgemein unter den Werten der Isopoden liegt.

Tab. 11 Kupfergehalt einiger Isopoden (WIESER 1961 a)
im Vergleich mit Orconectes limosus

Objekt	Kupfergehalt ganzer Tiere in % des Trockengewichts
<u>Orconectes limosus</u> (Raf.)	0,014 %
<u>Porcellio scaber</u> Ltr. (Suez)	0,032 %
<u>Porcellio scaber</u> Ltr. (Wien)	0,014 %
<u>Porcellio scaber</u> Ltr. (Cornwall)	0,106 %
<u>Amardillidium granulatum</u> Br. (Spanien)	0,063 %
<u>Amardillidium klugii</u> Br. (Spalato)	0,081 %
<u>Amardillidium vulgare</u> Ltr. (Wien)	0,049 %
<u>Cylisticus convexus</u> B.L. (Wien)	0,051 %
<u>Sysplastus brevicornis</u> Ebner (Elba)	0,028 %

Kupferreichstes Organ des Flußkrebsses ist die Miteldarmdrüse. Dieser Befund steht im Einklang mit Befunden an Porcellio scaber (WIESER 1961 a), Sphaeroma serratum (WIESER 1965 a), Maia squinado (ZUCKERKANDL 1959), Carcinus maenas (KERKUT, MORITZ und MUNDAY 1961), Octopus vulgaris (GHIRETTI und VIOLANTE 1958), Pecten maximus (CULKIN und RILEY 1958) und anderen. Tabelle 12 gibt einen Vergleich der Kupfergehalte von Organen.

Tab. 12 Kupfergehalte einiger Organe in % des Trockengewichts; (1) WIESER 1961 a, (2) CULKIN und RILEY 1958

Objekt	Mitteldarmdr.	Verdauungstrakt	Gonaden ♂ + ♀	Muskel
	Kupfer in % vom Trockengewicht			
<i>Orconectes limosus</i>	0,228	0,063	0,062	0,006
(1) <i>Porcellio scaber</i>	1,43	0,076		
(2) <i>Pecten maximus</i>	0,015	0,007	0,002	0,0007
(2) <i>Buccinum undatum</i>	0,008	0,003	0,002	0,0003

Die Mitteldarmdrüse von *Orconectes limosus* erreicht mit 0,046 % bezogen auf ihr Frischgewicht, bzw. 0,228 % des Trockengewichts den zweithöchsten Kupfergehalt, der je für ein tierisches Organ bestimmt wurde. Den bisher höchsten Kupfergehalt fand WIESER (1961 a) mit 1,43 % des Trockengewichts in den Leberschläuchen des terrestrischen Isopoden *Porcellio scaber* aus Cornwall, allerdings an Tieren, die sich 6 Jahre in Kultur befanden. Dieser Wert ist noch 3,3-mal höher als das Jahresmaximum der Mitteldarmdrüse von *Orconectes limosus*, welches bei 0,43 % vom Trockengewicht liegt. Obwohl die Landasseln durch ihren hohen Kupfergehalt auffielen, fanden WIESER und MAKART (1961) keine Zusammenhänge zwischen systematischer Stellung und Kupfergehalt.

In einer umfangreichen Untersuchung an Protozoen, Poriferen, Coelenteraten, Crustaceen, Mollusken und Echinodermen erkannten CULKIN und RILEY (1958), daß die Verdauungsdrüsen und Eingeweide gegenüber allen anderen Organen die höchsten Kupferkonzentrationen besitzen. In der nachfolgenden Tabelle 13 werden die Kupferkonzentrationen von Organen verschiedener Tiere gegenüber gestellt.

Tab. 13 Vergleich der Kupferkonzentrationen in den Organen von Orconectes limosus mit denen anderer Tiere; (1) KERKUT, MORITZ und MUNDAY 1961, (2) Orconectes limosus, (3) CULKIN und RILEY 1958, (4) HINSBERG-LANG 1957

O r g a n	Carcinus maenas (1)	Orconectes limosus (2)	Buccinum undatum (3)	Pecten maximus (3)	Verte- braten (4)
	µg Cu/g Frischgew.	µg Kupfer / g Trockengewicht		µg Cu/g Frischgew.	
Carapax	10	21			
Herz	3	806	87		0,7 - 2,7
Muskel	1	56	3	8	0,2 - 1,2
Kieme	39	529		6	
Mitteldarmdr.		2283	80	153	
Leber					1,2 - 9,0
Darm	10	968			1,0 - 2,0
Magen		304			
Eingeweide	7		29	71	
Nierenorgan		396	30		1,0 - 4,0
Gonade ♂		799		11	
Gonade ♀		445	28	27	
Nervensubst.		1432			2,0 - 4,0
Blutserum		1442			1,0 - 1,2

Man kann zusammenfassend sagen, daß Kupfer als Spurenelement offenbar in allen tierischen Organismen vorkommt. Allgemein besitzen Wirbellose mit hämocyanninhaltigem Blut (Arthropoden und Mollusken) einen höheren Kupferspiegel, obwohl systematische Unterschiede innerhalb dieser Gruppen nicht nachgewiesen werden konnten. Als kupferreichste Organe gelten Mitteldarmdrüse und Leber. Die Mitteldarmdrüse der Wirbellosen kann als Hauptspeicherorgan für Kupfer angesprochen werden (KERKUT und MUNDAY 1962; WIESER 1961 a; DESCHIENS, BERTRAND und MOLINARI 1958). In der Mitteldarmdrüse von Procambarus clarkii (OGURA 1959; MIYAWAKI und Mitarb. 1961) fand man sogar spezifische "Kupferzellen", in

deren Cytoplasmavakuolen experimentell gebotenes Kupfer angehäuft wurde.

2) Jahreszeitliche Änderungen des Kupferspiegels

Der Kupferspiegel der Organe von Orconectes limosus zeigt innerhalb des Jahres vornehmlich einen zweigipfligen Kurvenverlauf (s. die Abbildungen S. 22, 24-26, 29) mit einem Frühjahrsmaximum (Januar - März) und einem zweiten Gipfel im September/Okttober. Der Kupferspiegel weist auf Beziehungen zur Jahresrhythmik der Flußkrebse, die wesentlich durch den jahreszeitlichen Verlauf der Wassertemperatur beeinflusst wird. In vergleichbarer Weise erreicht auch die Mitteldarmdrüse von Ostrea gigas (HAYASHI 1961 a) ihr Jahresmaximum der Kupferkonzentration im September. Während BECK und SHEARD (1948) keine Beziehungen zwischen den Veränderungen der Blutkupferkonzentration ($43 - 208 \mu\text{g Cu/ml}$) von Panulirus longipes (M. EDWARDS) und der Jahresrhythmik der Tiere feststellen konnten, bestätigten KERKUT, MORITZ und MUNDAY (1961) die Abhängigkeit schwankender Kupferkonzentrationen von der Jahresrhythmik nach Untersuchungen an Mitteldarmdrüse ($15 - 150 \mu\text{g Cu/g}$) und Blut ($20 - 125 \mu\text{g Cu/g}$) von Carcinus maenas. Ein Vergleich zeigt, daß die jahreszeitlichen Schwankungen der Kupferkonzentration in der Mitteldarmdrüse von Orconectes limosus ($686 - 4348 \mu\text{g Cu/g}$ Organtrockengewicht) mit dem Faktor 6 weit geringer sind, als sie bei Carcinus maenas und Maia squinado mit dem Faktor 10 beobachtet wurden.

3) Einfluß der Häutung

Frischgehäutete Flußkrebse (Stadium B, Carapax noch ganz weich) zeigen gegenüber ungehäuteten Krebsen des gleichen Zeitabschnittes einen statistisch gesicherten Kupferverlust in Antennendrüssen, Hämolymphe und Schwanzmuskulatur (Tab. 6, S. 30). Auch Carcinus maenas (KERKUT und Mitarb. 1961) erreicht während der Ecdysis in Blut und Mitteldarmdrüse ein Kupferminimum. Der nachfolgende Kupferanstieg in diesen Organen wird mit einer aktiven Kupferaufnahme aus der Umgebung erklärt. Bei Maia squinado

konnte während der weichen Phase der Häutung Kupfer im Blut zuweilen ganz fehlen (n. ZUCKERKANDL 1957 ist das Hämocyanin in dieser Zeit für die Atmung entbehrlich). Nach der Häutung stieg der Kupfergehalt des Blutes wieder an, was ZUCKERKANDL auf eine dann notwendige Hämocyaninsynthese zurückführt.

Während bei Orconectes limosus (Raf.) der Kupferspiegel in der Mitteldarmdrüse zur Häutungszeit (seit Februar, Abb.5, S.24) stetig abnahm und im Juli und August sein Minimum erreichte, zeigten Ovar, Enddarm (♂), Bauchmark und Carapax als einzige Organe ihr Kupfermaximum in dieser Zeit. 2-3 Tage nach der Häutung waren die Kupfergehalte der Mitteldarmdrüse und des Carapax gegenüber ungehäuteten Vergleichstieren um 120 % bzw. 175 % erhöht (Tab.6, S.30). Der steile Kupferanstieg in der Mitteldarmdrüse könnte mit der Hypothese von ZUCKERKANDL durch eine aktive Kupferaufnahme und eine eventuell nach der Häutung verstärkt einsetzende Hämocyaninsynthese erklärt werden, durch welche dann später auch der Kupfer- und Hämocyaningehalt des Blutes auf seinen normalen Wert angehoben werden könnte.

Im Blick auf die Veränderung im Kupfergehalt der Organe innerhalb eines Jahres und unter dem Einfluß der Häutung ist der Zusammenhang zwischen Kupfergehalt und dem Trockengewicht der Organe zu diskutieren. Als Bezugsbasis der Kupferbestimmung wurde das Trockengewicht der Organe gewählt. Eine stetige Nahrungsaufnahme nach der Häutungszeit aber hebt den Trockengewichtsanteil der Organe an und verursacht das gleichmäßige Absinken der Kupferkonzentration (bezogen auf Trockengewicht) in der Mitteldarmdrüse zum Januar hin wesentlich. Eine in den Wintermonaten erfolgende Mobilisierung körpereigener Substanzen zur Aufrechterhaltung lebenswichtiger Prozesse auch bei verringerter Nahrungszufuhr, also ein Verbrauch von Fetten und Eiweißen (den Trockengewichtsanteil der Mitteldarmdrüse wesentlich mitbestimmend), erklärt weitgehend das Kupfermaximum im Frühjahr (Febr.). Diese Überlegungen wurden durch eine Jahreskurve des Trockengewichtsanteiles der Mitteldarmdrüse an ihrem Frischgewicht

unterstützt, die nach stetiger Zunahme, bis zu einem Gipfel im Dezember, einen Abfall auf ein Aprilminimum zeigte. Eine weitere Bestätigung boten die in Tabelle 7 (S. 33) vorgelegten Befunde an Tieren, die in deionisiertem Wasser lebend gefüttert wurden bzw. hungern mußten. Während die Kupferkonzentration in der Mitteldarmdrüse hungernder Krebse um mehr als 300 % anstieg, war bei gefütterten Tieren keine Zunahme der Kupferkonzentration zu beobachten.

Man darf also nach diesen Überlegungen vermuten, daß der Frühjahrsgipfel der Jahreskurven wesentlich einen Konzentrationsgewinn des Kupfers in den Organen repräsentiert und daß die eigentliche Zunahme der Kupfermenge in den Organen durch den Gipfel nach der Häutung (Mitteldarmdrüse im September) angezeigt wird.

4) Geschlechtsunterschiede

Geschlechtsunterschiede im Kupferspiegel finden sich bei Orconectes limosus (Raf.) in allen Organen (s. Abb. 4, 5, 6) und konnten statistisch eindeutig gesichert werden. In den Jahreskurven weisen Pfeile auf Monate mit signifikanten Geschlechtsunterschieden im Kupferspiegel der Organe hin.

Statistisch gesicherte Geschlechtsunterschiede mit einem höheren Kupfergehalt der Weibchen fanden HORN und KERR (1963) bei Callinectes sapidus (Rathurn). Dagegen konnten nach BECK und SHEARD (1948) Geschlechtsunterschiede im Kupfergehalt der Organe von Panulirus longipes statistisch nicht gesichert werden.

2. Experimentelle Beeinflußbarkeit des Kupferspiegels

5) Einfluß des Hungerns

Zweimonatiges Hungern in Leitungswasser bewirkte in den Organen von Orconectes limosus (Raf.) einen allgemeinen Kupferanstieg, der für Schwanzmuskel und Blut statistisch eindeutig zu sichern war (Tab. 7, S. 33). Gleichzeitige Haltung ohne Nahrung in deionisiertem Wasser (Tab. 7, S. 33) bestätigte die Tendenz der Kupfer-

zunahmen während des Hungerns und gestattete eine zusätzliche statistische Sicherung des Kupferanstieges in Mitteldarmdrüse und Vas deferens. Mandibelmuskeln und Carapax lagen in beiden Haltungsversuchen unter dem Niveau der Vergleichsgruppe.

Der Kupferanstieg in der Mitteldarmdrüse der Flußkrebse geht bei lang dauerndem Hunger eindeutig auf den bereits diskutierten (S. 55-56) Verlust der Bezugsbasis Trockengewicht zurück. Dies wird durch Tiere bestätigt, die während ihres Aufenthaltes in deionisiertem Wasser regelmäßig gefüttert wurden und dabei keine Zunahme der Kupferkonzentration in der Mitteldarmdrüse aufwiesen (Tab. 7, S. 33). Einige Versuchstiere hatten während des Hungerns ihre Mitteldarmdrüse bis zur Unkenntlichkeit aufgezehrt.

Vergleichbare Literaturaussagen sind zu diesen Fragen nicht bekannt. Wir erfahren lediglich über Maia squinado (ZUCKERKANDL 1957), daß die Tiere nach der Häutung zur Resynthese des Hämocyanins unbedingt Nahrung aufnehmen müssen.

6) Beeinflussung durch Kupfer des Außenmediums

Orconectes limosus (Raf.) wurde ohne Nahrung in kupferhaltigen Außenmedien gehalten. Es zeigte sich ein statistisch gesicherter Einfluß der Kupfermedien auf den Kupferspiegel der Organe (Tab. 8, S. 36). Abweichend von der allgemeinen Kupferzunahme in den Organen war die Kupferkonzentration der Hämolymphe signifikant erniedrigt, und auch für das Bauchmark ist eine Abnahme des Kupfers angedeutet. Bei gestorbenen Tieren dieser Gruppen waren im Kupferspiegel der Organe keine wesentlichen Unterschiede zu überlebenden Krebsen zu beobachten.

Nach allen dieser Versuche fällt ein enormer Anstieg der Kupferkonzentration in der Kieme auf (z.B. um 1300 % bei zweimonatigem Aufenthalt in 100 µg Cu/ml Leitungswasser), was, ebenso wie die um 170 % erhöhte Kupferkonzentration des Carapax, zunächst nur auf äußerlich adsorbiertes Kupfer hinzuweisen braucht. Die schädigenden Wirkungen derartigen im Außenmedium gebotenen Kupfers könnten also allein

in einer Beeinträchtigung der Kiemenpermeabilität liegen. Die Kupferzunahmen in den Organen der Versuchstiere aber lassen erwarten, daß Kupfer auch über die Kiemen in das Blutsystem von Orconectes limosus gelangt. Aufgrund der Reaktionen isolierter Organe von Carcinus maenas auf Kupfer, äußerten KERKUT und MUNDAY (1927) die Vermutung, daß der Wirkort toxischen Kupfers im Herzen zu suchen sei, denn Herz und Kieme reagierten als isolierte Organe am empfindlichsten auf Kupfer. Diese Erwartungen können durch die Bestimmungen der Kupfergehalte in den Organen von Orconectes limosus nicht gestützt werden. Die Kupfererhöhungen in den Kiemen und Herzen gestorbener Versuchstiere blieben vielmehr mit 170 % bzw. 10 % weit hinter denen Überlebender zurück (Tab.8, S. 36).

7) Toxizität des Kupfers

Die eigentlichen Toxizitätsversuche waren auf die Frage gerichtet, wie hoch die Giftigkeit des Kupfers (dargeboten im Außenmedium, durch Injektion in das Blut und über den Magen) für Orconectes limosus (Raf.) ist. Es sollte geklärt werden, ob dem Flußkrebis eine gegen andere Tiere wesentlich unterschiedene Empfindlichkeit auf Kupfer, seinem Atmungsmetall, zukommt und ob der Wirkort des Kupfers vielleicht in einem bestimmten Organ zu lokalisieren ist.

Den Ergebnissen bei Orconectes limosus(Raf.) seien zunächst eine Reihe von Literaturbefunden zu diesem Thema vorangestellt. CORNER und SPARROW (1956) verweisen auf die Geltung zweier konkurrierender Theorien (PYEFINCH & MOTT 1948) über die Toxizität von Kupfer und Quecksilber auf Crustaceen : (1) Die Ionen wirken toxisch durch Inaktivierung von Lebensprozessen, die an tierischen Oberflächen ablaufen, oder : (2) sie werden zunächst resorbiert und wirken im Tier durch Inhibition von Stoffwechselvorgängen. Die Verfasser prüften selbst die Giftwirkungen von Quecksilberchlorid, Quecksilberäthylchlorid, Quecksilberjodid und Kupfer-Natriumcitrat auf Artemia salina, Elminius modestus und Arcatia clausi. Die Sensibilität der Tiere erwies sich als unterschied-

lich; Artemia zeigte sich am unempfindlichsten. Ein Gemisch aus Kupfer- und Quecksilbersalzen zeigte bei Artemia eine mehr als additive Giftwirkung. Im Unterschied zu Quecksilber zeigte Kupfer einen besonderen Einfluß auf die Respiration und Beweglichkeit von Artemia-Larven. BARNES und STANBURY (1949) untersuchten die toxischen Wirkungen von Kupfer und Quecksilber auf den Copepoden Nitocra spinipes (Boeck). Eine zehnfache Kupfererhöhung von 0,26 auf 2,6 µg Kupfer/ml Blut steigerte die Letalität von 11 % auf 21 %. Beide Salze haben unterschiedliche Wirkungsmodi und greifen entweder verschiedene Systeme oder getrennte Bereiche desselben Systems an. Auch hier zeigte die Mischung von Kupfer und Quecksilber eine mehr als nur additive Giftwirkung, und es wird eingeräumt, daß diese Erscheinung auf eine gegenseitige Unterstützung der Ionen, beispielsweise beim Membrandurchtritt (Permeabilitätsänderungen), zurückgehen könnte. BERNARD und LANE (1963) fanden für die planktonische Cypris von Balanus amphitrite niveus, daß eine Erhöhung des normalen Kupfergehaltes im Seewasser von 0,005 auf 5,0 µg Cu/ml den O₂-Umsatz zunächst um 50 % steigerte, aber bei weiterer Konzentrationserhöhung linear zur Konzentration senkte. Bei 50 µg Cu/ml ließ bereits die Aktivität der Tiere nach, bei 100 µg Cu/ml waren keine Antennen- und Schwimmbewegungen mehr zu beobachten und eine Kupferkonzentration zwischen 100 - 200 µg Cu/ml senkte die Dauer des Überlebens auf 20 %. HOLM-JENSEN (1948) boten Daphnia magna Ag, Cu, Hg, und Pb in drei verschiedenen Medien. In einer Lösung von Ozeanwasser, das 1000-mal mit einer Lösung von 0,1 mM Ca(HCO₃)₂/L verdünnt war, schien die toxische Wirkung der 4 Metalle am größten zu sein. In Ozeanwasser, das 100-mal mit einer Lösung von 0,2 mM NaHCO₃/L doppelt destillierten Wassers verdünnt war, lag die in weniger als 24 Stunden letale Konzentration bei 0,01 µg Ag/ml, 0,03 µg Hg/ml und 0,03 µg Cu/ml. Glutathion konnte die Tiere vor Vergiftung durch Kupfer und Quecksilber schützen, während Cystein einen derartigen Schutz nur gegen Kupfer bot. Für Asellus aquaticus fanden JANDA und BABICKA (1935) unabhängig von Fütterung und Hungern folgende Wirkungen

unterschiedlicher CuCl_2 -Konzentrationen : Tod aller Tiere nach 24 h bei 1000 $\mu\text{g Cu/ml}$, Tod nach 6 bis 14 Tagen bei 100 $\mu\text{g Cu/ml}$ und keine toxische Wirkung innerhalb mehrerer Wochen bei einer Kupferkonzentration von 10 $\mu\text{g Cu/ml}$. Hungertiere schienen dabei Kupfer stärker zu resorbieren als normal ernährte Wasseraseln. FRAGA de AZEVEDO und CRAVAO GOMES (1956) beobachteten toxische Wirkungen von Cu^{64} -Medien auf Süßwassermollusken (Planorbarius metidjensis, P. corneus, Biophalaria Pfeifferi, Australorbis glabratus und Melania tuberculata). MARKS (1938) untersuchte Kupfergehalte und Kupfertoleranzen einer Reihe von Mollusken (Helix pomatia, Polyphemus bimaculatus, Paphia staminea var. laciniata) und sah, daß die obere Grenze der Kupfertoleranz für die meisten der untersuchten Arten im Bereich von 0,10 - 0,20 $\mu\text{g Cu/ml}$ Seewasser, also 100 - 200 mal höher als der Normalgehalt des Seewassers lag. Die Planorbien Planorbis glabratus und Bulius truncatus erwiesen sich bei Versuchen von DESCHIENS, BERTRAND und MOLINARI (1958) gegen Zn^{++} , Cu^+ , Ba^{++} , NO_3^- und NO_2^- allgemein 100-mal empfindlicher als Krebse und Fische es sein sollen.

HORST (1954) berichtet nach Versuchen mit Mäusen und Menschen, daß Kupfer-64 in unphysiologisch hohen Gaben an die Serumalbumine gebunden wird. PETERS, SHORTHOUSE und WALSHE (1965) injizierten Kupfer direkt unter die Gehirnhaut mit Äther betäubter Tauben, was bei 10 - 20 $\mu\text{g Cu}^{++}$ zu Krämpfen und Tod führte. Studien mit Kupfer-64 ergaben, daß das meiste Kupfer an das unlösliche Neurokeratin gebunden wurde und nur kleinere Anteile für die toxischen Wirkungen verantwortlich waren. Es wurde eine Hemmung der Membran-ATPase im Taubengehirn durch kleinste Kupfergaben beobachtet, und die Autoren schließen daraus, daß die Störungen bei Tauben durch den Einfluß des Kupfers auf die Ionen-Pumpe und Veränderungen der Membrandurchlässigkeit ausgelöst wurden.

Ich habe in den Toxizitätsversuchen Orconectes limosus zunächst abnorm hohen Kupferkonzentrationen des Außenmediums (150, 200, 250 und 300 $\mu\text{g Cu/ml}$ Leitungswasser)

ausgesetzt. Die Letalität stieg dabei mit der Konzentration und der Zeit (Abb. 7, S. 39). Die mittlere letale Dosis des Außenkupfers wurde mit $230 \pm 9 \mu\text{g}$ Kupfer/ml Leitungswasser bestimmt. Diese LD_{50} entspricht etwa der doppelten Kupferkonzentration des Krebsblutes und ist sechsmal höher als der Anteil niedermolekularen Kupfers im Blut. Die toxische Wirkung von Kupferaußenmedien auf Flußkrebse ist offenbar geringer als bei einigen anderen Tieren :

		Dosis (mg Cu/L)
<u>Orconectes limosus</u> (Raf.)	LD_{50}	= 230,0
<u>Nitocra spinipes</u> (Boeck) (BARNES und STANBURY 1949)	LD_{50}	= 26,0
<u>Daphnia magna</u> (HOLM-JENSEN 1948)	100 % Tote/ 24 h	bei 0,03
<u>Asellus aquaticus</u> (JANDA 1935)	100 % Tote/ 24 h	bei 1,0

Kupferinjektionen in das Blut von Orconectes limosus (einer Erhöhung des Blutkupfers um etwa 50, 75 und 100 % entsprechend) führten nach 7 Tagen zu den Todesraten 70 %, 81 % und 100 % (Abb. 8, S. 41). Eine LD_{50} war aus dem Zahlenmaterial nicht zu berechnen (zur Probittransformation sind mindestens drei Zahlenwerte nötig, unter denen kein 100 %-Wert sein darf). Die Überlebenden, injizierten Krebse zeigten im Vergleich zu nicht injizierten Tieren signifikante Erhöhungen der Kupferkonzentration in Antennendrüsen, Mitteldarmdrüse, Mandibelmuskeln und, neben weiteren nicht zu sichernden Steigerungen, eine Abnahme des Kupfers im Schwanzmuskel und Bauchmark (Tab. 9, S. 42). Im Vergleich zu diesen Überlebenden zeigten gestorbene Krebse nach Injektion neben einer starken Zunahme der Kupferkonzentration im Magen eine signifikante Kupferabnahme im Bauchmark.

Die Injektionsversuche zeigen, daß in das Blut verabreichtes Kupfer bei geringeren Dosen und in kürzerer Zeit seine toxischen Wirkungen hervorruft, als es für

Kupfer im Außenmedium beobachtet wurde. Der Blutkupfer-
spiegel wurde nach der Injektion schnell wieder norma-
lisiert, was für die Existenz eines Kontrollmechanis-
mus spricht. Die von KERKUT und MUNDAY (1962) für Car-
cinus maenas beschriebene Ansammlung injizierter Kupfer-
salze im Herzen, konnte auch nach Kupferinjektionen bei
Orconectes limosus nicht beobachtet werden.

Kupfergaben in den Magen zeigten keine tödlichen
Wirkungen auf Orconectes limosus, obwohl hier gegenüber
Injektionsversuchen viermal höhere Kupfermengen verab-
reicht wurden und sich der Kupfergehalt derart behan-
delter Krebse zu erhöhen schien (Tab. 10, S. 45). Der
Enddarm zeigt eine signifikante Zunahme seiner Kupfer-
konzentration.

Es ist anzunehmen, daß die Flußkrebse das Kupfer
unter natürlichen Bedingungen mit der Nahrung aktiv und
selektiv aufnehmen (wie Ostrea gigas, HAYASHI 1961) und
daß daher ein experimentelles Kupferangebot über den
Magen auf ein intaktes Sicherungssystem stößt, welches
als Regulator einer optimalen Kupferkonstanz das Metall
annimmt, speichert oder ausscheidet. Die Kupferanreiche-
rung im Enddarm der Krebse könnte für die Ausscheidung
eines Kupferüberangebotes sprechen und das Überleben
aller Versuchstiere erklären. Auch bei Drosophiliden
wurde eine Anreicherung von Kupfer auf der Darmoberflä-
che (POULSON und Mitarb. 1952) beobachtet. Hunde und
Ratten (GLASS 1950) schieden in der Nahrung dargebote-
nes Cu⁶⁴ zu 3/4 mit den Fäces und zu 3 % mit dem Urin
aus, während nach intravenöser Gabe von Cu⁶⁴ nur 6 %
zur Ausscheidung gelangten.

Ein Überblick all dieser Ergebnisse läßt eine ein-
seitige Entscheidung zu dem von CORNER und SPARROW 1956
aufgezeigten Widerstreit zweier konkurrierender Theorien
über die toxischen Wirkungen von Metallionen nicht zu.
Man muß vielmehr einräumen, daß das Kupfer wohl einen
toxischen Effekt auf Prozesse der Körperoberflächen und
Membranen besitzen könnte, was als Primäreffekt durch
die hier vorgenommenen Versuche an Flußkrebsen nicht aus-

geschlossen wird, daß es ganz sicher aber einen weiteren toxischen Einfluß durch die Störung innerer Prozesse, namentlich durch die Inhibition von Enzymreaktionen, auszuüben vermag.

3. Zur Form des Kupfers im Organismus

8) Das Verhältnis von "freiem" zu gebundenem Kupfer

Die Anteile niedermolekularen (sog. "freien") Kupfers wurden für Orconectes limosus mit 38 % im Blut und mit 25 % in der Mitteldarmdrüse durch verschiedene Verfahren bestimmt und gesichert. Es handelt sich bei dieser Form um nichtproteingebundenes Kupfer, welches aber sicherlich in Bindung an Aminosäuren und kleine Peptide vorliegt, also druckfiltrierbar und dialysabel ist. Man darf nach Untersuchungen von NEUMANN und SILVERBERG (1966, 1967) an Hunden und Ratten vermuten, daß derartige Aminosäurekupfer auch für den Flußkrebis eine besondere Transportform für die Passage durch Blut-Gewebsschranken darstellt. Darüber hinaus könnte es auch Aufgaben als Kupferdonator, z.B. bei der Resynthese des Hämocyanins aus dem Apohämocyanin, erfüllen.

In der Literatur werden nur beiläufige Vermutungen über die Anteile "freien" Kupfers am Gesamtkupfer der Tiere geäußert. So erklärten KERKUT, MORITZ und MUNDAY (1961), daß sich das Blutkupfer von Carcinus maenas bei Dialysen nicht in ein freies Gleichgewicht bringen ließ und daher nicht ional vorliegen könne. WIESER (1961 a) schloß aus der direkten Reaktion des Kupfers in der Mitteldarmdrüse der Isopoden mit dem Farbreagenz, daß die Hauptmenge des Kupfers nicht proteingebunden vorlag. Nach FLASCHENTRAGER und LEHNARTZ (1961) ist der weitaus größte Teil des Serumkupfers der Wirbeltiere an ein Globulin (Coeruloplasmin) und der Rest an ein Albumin (Hämocuprein) gebunden. In den Augen der von BOWNESS und MORTON (1952 a,b) untersuchten Fische und Amphibien (Salmotrutta, Regan, Perca fluviatilis, Rana esculenta

und Rana temporaria) lagen 50 % des Kupfers in Bindung an ein Pigmentprotein der Aderhaut vor.

9) Kupferproteide

In der Literatur werden immer wieder folgende Kupfererweißverbindungen genannt : Hämocyanin, Coeruloplasmin, die wahrscheinlich chemisch identischen Erythro-, Cerebro-, Hepato- und Hämocupreine, Plastocyanin, Azurin, Kupfer-II-conalbumin, Cytochrom-Oxydase, Phenol-oxydase, Tyrosinase, Ascorbinsäure-Oxydase, Laccase und weitere kupferhaltige Enzyme.

Das wichtigste Kupferprotein der Wirbellosen ist das Hämocyanin. Hämocyanine sind die respiratorischen Blutfarbstoffe vieler Arthropoden und Mollusken. Sie transportieren die Atemgase im Blut (zwei Atome Kupfer binden ein Atom Sauerstoff), liegen zellfrei vor und unterscheiden sich voneinander durch arttägige Molekulargewichte (MW), isoelektrische Punkte (IEP), Kupfergehalte (Arthropoden 0,17 - 0,19 % Cu, Mollusken 0,24 - 0,25 % Cu) und unterschiedliche O₂-Dissoziationskurven.

Tab. 14 Vergleich einiger Hämocyanine

(1) FLASCHENTRÄGER und LEHNARTZ 1951, (2) BURTON 1965, (3) KUBOWITZ 1938, (4) HOLDE und COHEN 1964, (5) REDFIELD in Mc ELROY & GLASS 1950, (6) JOUBERT 1954, (7) RAWLINSON 1940, (8) ALLISON und COLE 1940, (9) LAUFER und SWABY 1955

Objekt	MW	IEP (pH)	Cu-Gehalt (%)
Helix	(1) 6 000 000	5,05	(2,3) 0,25
Loligo	(4) 3 750 000		(4,3) 0,24-0,26
Busycon			(5) 0,245
Jasus	(6) 496 000	4,65	(5) 0,148
Panulirus		(7) 4,6	0,148
Cancer		(8) 4,7	
Homarus	(9) 825 000	(1,8) 4,9	(3) 0,187
Limulus		(1) 6,3	(3) 0,176
Orconectes limosus (Raf.)			0,175

Das Kupfer in den Hämocyaninen wurde als ein- und (bzw. oder) zweiwertig bestimmt (FRIEDEN, OSAKI und KOBAYASHI 1965 a). Die Hämocyanine dissoziieren bei kleinsten Ionenänderungen reversibel in Untereinheiten (LONTIE und Mitarb. 1965 an Helix; PICKETT und Mitarb. 1966 an Homarus; HOLDE und COHEN 1964 an Loligo). Das Kupfer kann den Komplex unter Bildung des Apohämocyanins reversibel verlassen. Die Hämocyanine besitzen stets zwei elektrophoretische Banden (DENUCE' und KÜHN 1962) und zeigen meist eine Pseudoperoxydase-Aktivität (DECLEIR 1965).

WIESER (1965 a) fand, daß der Hämocyaningehalt des Blutes bei Isopoden und Amphibien mit der terrestrischen Lebensweise abnimmt. Er bestimmte im Blut von 12 Isopoden und 3 Amphipoden (1965 b) Hämocyanin und bemerkte bei vielen außerdem noch Proteine geringerer elektrophoretischer Mobilität, die bei Conilera cylindracea auch Kupfer enthalten sollen, aber keinen Zusammenhang zum Häutungs-geschehen erkennen ließen. CROWLEY (1963) beobachtete in der Hämolymphe von Astacus astacus, A. nigrescens, Orconectes virilis, O. bartonii und Procambarus clarkii vier artspezifische Proteinbanden während der Zwischenhäutung (Nov.) und eine 5. Bande zur Vorhäutung (Mai), die wahrscheinlich in Verbindung zum Häutungsprozess steht. PRYOR (1952), der die Hämocyanine verschiedener Formen serologisch miteinander verglich, sah eine enge Verwandtschaft ihrer Eigenschaften innerhalb der Orconectes-Arten Orconectes immunis, O. nais, O. virilis und fand kein weiteres Blutprotein. BAYER und FIEDLER widmeten sich 1962 dem Aufbau und der Spezifität des Hämocyanins von Octopus vulgaris. Kupfer erwies sich dabei als direkt an das Protein gebunden und einwertig. Es änderte auch bei Anlagerung von Sauerstoff seine Wertigkeit nicht und verließ unter Kaliumcyanid-Einfluß bei Dialyse zu 3/4 die Komplexbindung zur Bildung des Apohämocyanins. Bei der Aminosäureanalyse des Hämocyanins traten Cystein und Kupfer bemerkenswerterweise im Molverhältnis 1 : 1 auf, woraus die Verfasser vorbehaltlich schließen, "daß der Schwefel des Cysteins für die koordinative Bindung des Kupfers verantwortlich

ist. Das Vorkommen einer prostetischen Gruppe darf nach diesen Untersuchungen ausgeschlossen werden" (S. 153). Elektronenmikroskopische Untersuchungen (Van BRUGGEN und Mitarb. 1963) zeigten, daß das Hämocyanin von Nep-tunea antiqua aus 3, von Helix pomatia und Buccinum undatum aus 6 und das von Crustaceen aus 8 Untereinheiten aufgebaut ist.

Die eigenen Befunde an Orconectes limosus stimmen mit den vorgenannten Literaturangaben überein, gehen aber mit der Feststellung intrazellulären Hämocyanins und Apohämocyanins in der Mitteldarmdrüse und vor allem durch die Isolierung zweier weiterer Kupferproteide aus diesem Organ über die bisherigen Kenntnisse hinaus.

Das Blutserum von Orconectes limosus zeigte mit zwei Ausnahmen stets nur zwei Proteinbanden, die als Hämocyanin und Apohämocyanin mit einem Kupfergehalt von 0,174 % bzw. 0,075 % identifiziert werden konnten. Lediglich bei zwei Blutproben des Monats Juli konnten 1-2 sehr schnell laufende Proteinbanden beobachtet werden, bei denen es sich wahrscheinlich um Gerinnungstoffe des Plasmas handeln dürfte. Das Verhältnis von Hämocyanin zu Apohämocyanin im Blut der Flußkrebse ist mit 66 % : 34 % sehr gut den Befunden an Callinectes sapidus Rathurn mit 70 % : 30 % (HORN und KERR 1963) vergleichbar. Auch der Kupfergehalt des Hämocyanins (0,174 %) liegt eindeutig in dem für Arthropoden angegebenen Bereich von 0,17 - 0,19 % Kupfer.

Das Proteinspektrum der Mitteldarmdrüse von Orconectes limosus wies mit 13 stets reproduzierbaren Proteinbanden die erwartete Fülle auf (Abb. 9, S. 48). Unter diesen Banden wurden vier Kupferproteide identifiziert und elektrophoretisch isoliert (Bande 1, 2, 7, 12). Es handelt sich dabei eindeutig um das auch in der Hämolymphe identifizierte Hämocyanin (Bande 2) und das etwas langsamer wandernde Apohämocyanin (Bande 1), deren Kupfergehalte sich mit 0,176 bzw. 0,081 % nicht wesentlich von denen der Blutproteide unterscheiden.

Besonderes Interesse erregen die beiden anderen Kupferproteide der Banden 7 und 12. Sie sind elektro-

phoretisch wesentlich mobiler und wandern viermal (7) bzw. achtmal schneller als das Hämocyanin der Flußkrebse (Abb. 9, S. 48). Tyrosinase- und Katalaseaktivität waren ihnen nicht zuzuordnen. Die Kupfergehalte dieser beiden Proteide liegen mit 0,047 % in "7" und 0,029 % in "12" um die Faktoren 3,6 bzw. 5,8 unter dem Kupfergehalt des Hämocyanins. Aus dem Wanderungsverhalten beider Banden kann geschlossen werden, daß es sich um kleinere Moleküle handelt.

10) Hypothese zur Hämocyaninsynthese des Flußkrebsses

Versucht man die Befunde der Kupferproteide in der Mitteldarmdrüse des Orconectes limosus (Raf.) spekulativ in ein Schema zu bringen, das als Arbeitshypothese einer späteren Untersuchung der Hämocyaninsynthese zugrunde liegen könnte, dann ließe sich folgendes Bild entwerfen : Die Mitteldarmdrüse ist der Ort der Hämocyaninsynthese. Kupfer wird ihr nach aktiver und selektiver Aufnahme zugeführt und dort bis zum Einbau in das Hämocyanin deponiert. Hämocyanin liegt ebenso wie seine kupferärmere Form, das Apohämocyanin, in der Mitteldarmdrüse vor, wird von hier aus in die Hämolymphe abgegeben und tritt im Blut mit den gleichen Kupferverhältnissen auf. Niedermolekulares Kupfer (25 % in der Mitteldarmdrüse und 38 % des Blutkupfers) ist aminosäure- und peptidgebunden, dient der Kupferreserve und kann bei notwendig werdender Erhöhung der Sauerstoff-Transportleistung des Blutes an das Apohämocyanin gebunden werden (Rekombinationsfaktor nach LONTIE 1965 bei 95,5 %) . Während in der Hämolymphe bei 38 % niedermolekularen Kupfers 40 % des Kupfers auf das Hämocyanin und 22 % auf das Apohämocyanin entfallen, übernehmen in der Mitteldarmdrüse bei 25 % niedermolekularen Kupfers die beiden Proteide "7" und "12" etwa 50 % des Gesamtkupfers. Bedenkt man nun, daß die Kupferproteide "7" und "12" nur in der Mitteldarmdrüse, dem Ort der Kupferspeicherung und wahrscheinlich auch der Hämocyaninsynthese , auftreten, so liegt es nahe, diesen beiden Komponenten

eine Rolle bei der Hämocyaninsynthese zuzudenken.

Es wäre nun die Aufgabe einer weiteren Untersuchung unter Verabreichung ^{14}C -markierter Aminosäuren und von Cu^{64} , Aufnahme, Schicksal und Einbau von Kohlenstoff und Kupfer in das Hämocyanin zu verfolgen.

Z u s a m m e n f a s s u n g

- 1 Es wurde der Kupfergehalt des Flußkrebsses Orconectes limosus (Raf.) mit 0,0042 % des Körperfrischgewichts (42 µg Cu/g Körperfrischgewicht) bestimmt. Das Trockengewicht ganzer Krebse liegt bei 30 % .
- 2 Es wurde das extrazelluläre Blutvolumen über den Kupfergehalt mit 20 % vom Körpervolumen errechnet.
- 3 Ein Vergleich der Jahresmittel im Kupfergehalt zeichnet die Mitteldarmdrüse mit 0,23 % des Trockengewichts (2283 µg Cu/g Organtrockengewicht) als das kupferreichste Organ des Flußkrebsses aus. Die Mitteldarmdrüse erreicht in ihrem Jahresmaximum (Februar) mit 0,43 % des Organtrockengewichts (4348 µg Cu/g) den zweithöchsten Kupfergehalt, der je für ein tierisches Organ bestimmt wurde.
- 4 Es wurde der Jahresverlauf des Kupferspiegels aller Organe des Flußkrebsses verfolgt und eine auffällige Zweigipfligkeit beobachtet, deren Höchstwerte vor und kurz nach der Häutungsperiode erreicht werden. Als einzige Organe erreichen Ovar (Juni), Bauchmark (Juni/Juli) und Carapax (Juli) ihre Jahresmaxima in der Haupthäutungszeit.
- 5 Der Kupferspiegel der Organe zeigt Beziehungen zum Häutungsgeschehen. Er ist bei frisch gehäuteten Tieren (Stadium B) mit Ausnahme von Mitteldarmdrüse und Carapax in den Organen erniedrigt.
- 6 Geschlechtsunterschiede in den Kupferkonzentrationen konnten bei allen Organen statistisch gesichert werden. Sie gelten auch für den mittleren Kupfergehalt der Organe und den prozentualen Anteil einzelner Organe am Gesamtkupfergehalt der Krebsorgane.
- 7 Die Kupferkonzentration der Organe ist experimentell beeinflusbar. Lang dauerndes Hungern führte durch Trockengewichtsverluste zu Erhöhungen der Kupferkonzentrationen, nicht jedoch auch der Kupfermengen in den Organen.

- 8 Ein zweimonatiger Aufenthalt in deionisiertem Wasser wird unabhängig von der Fütterung nur sehr schlecht vertragen und führte in 56 Tagen zu 38 % Todesfällen.
- 9 Zweimonatiger Aufenthalt in kupferhaltigen Außenmedien von 40 und 100 µg Cu/ml Leitungswasser, Konzentrationen, die dem Anteil niedermolekularen Kupfers bzw. des Gesamtkupfers/ml Blut entsprechen, führte zu Sterbequoten von 58 % und 85 %. Überlebende Tiere zeigten verringerte Kupferkonzentrationen in Blut und Bauchmark neben signifikanten Zunahmen in Mitteldarmdrüse, Enddarm, Magen, Vas deferens, Carapax und vor allem in der Kieme.
- 10 Der Aufenthalt in Kupfermedien abnorm hoher Kupferkonzentrationen (150, 200, 250 und 300 µg Cu/ml Leitungswasser) bewirkte nach 8 Versuchstagen eine Letalität von 4 %, 21 %, 57 % und 100 % in der Reihenfolge steigender Kupferkonzentration im Medium. Hieraus ergab sich eine mittlere letale Dosis von kupferhaltigen Außenmedien für Orconectes limosus mit $LD_{50} = 230 \pm 9 \mu\text{g Cu/ml}$ Leitungswasser, womit sich der Flußkrebis im Vergleich zu einigen anderen Tieren als weit unempfindlicher gegen Kupfer im Außenmedium erwies.
- 11 Eine experimentelle Erhöhung des Blutkupferspiegels um etwa 50 %, 75 % und 100 % verursachte nach 7 Tagen eine Todesrate von 70 %, 81 % und 100 %. Die Kupferkonzentration fast aller Organe (4 Tage nach der Injektion, paralleler Ansatz) nahm signifikant zu, während sie in der Hämolymphe bald wieder normalisiert wurde und im Bauchmark signifikant erniedrigt war. Gestorbene Krebse zeigten im Vergleich zu Überlebenden signifikante Konzentrationserhöhungen in Magen und Schwanzmuskel.
- 12 Abnorm hohe Kupfergaben in den Magen wirkten auf Orconectes limosus nicht letal, beeinflussten aber den Kupferspiegel der Organe (z.B. Erhöhung in Mitteldarmdrüse, Enddarm, Vas deferens, Hypodermis). Eine statistisch gesicherte Kupferzunahme im Enddarm um 140 % scheint für die Ausscheidung eines gefährlichen Kupferüberangebotes zu sprechen.

- 13 Der Anteil niedermolekularen (sog. "freien") Kupfers wurde durch verschiedene Verfahren für die Mitteldarmdrüse mit 25 % bestimmt und lag in der Hämolymphe bei 38 % ihres Gesamtkupfers.
- 14 Es wurde aus der Hämolymphe das Hämocyanin präparativ gewonnen und daraus experimentell das Apo-Hämocyanin dargestellt.
- 15 Die Elektrophorese wies die beiden einzigen Proteine des Blutserums von Orconectes limosus als die bekannten Kupferproteide Hämocyanin (0,174 % Cu) und Apohämocyanin (0,075 % Cu) aus, die im Verhältnis von 2 : 1 vorliegen.
- 16 Im Proteinmuster der Mitteldarmdrüse (13 Banden) wurden vier Kupferproteide identifiziert. Sie konnten durch Disc-Elektrophorese mit kontinuierlicher Elution (Acrylamid-Gel) als Hämocyanin (mit 0,176 % Cu), Apohämocyanin (0,081 % Cu) und zwei bisher unbekannte Kupferproteide der elektrophoretisch mobileren Banden "7" (0,047 % Cu) und "12" (0,029 % Cu) identifiziert und isoliert werden.
- 17 Das Vorkommen intrazellulären Hämocyanins und Apohämocyanins in der Mitteldarmdrüse neben zwei weiteren Kupferproteiden geringeren Kupfergehaltes und wahrscheinlich geringerer Molekülgröße spricht dafür, daß dieses Organ das Speicherorgan für Kupfer und der Ort der Hämocyaninsynthese ist.

- ALLISON, J.B. and COLE, W.H. (1940)
The Nitrogen, Copper and Hemocyanin Content of
the Sera of several Arthropods
J. biol. Chem. 135, 259-265
- BARNES, H. and F.A. STANBURY (1949)
The toxic action of copper and mercury salts both
separately and when mixed on the harp-actinid
copepod, Nitocra spinipes (Boeck)
J. exp. Biol. 25.26, 271-275
- BAYER, E. und H. FIEDLER (1962)
Aufbau und Spezifität des Hämocyanins
Annal. Chem. 653, 149-156
- BELITZ, H.J. (1960)
Die Anwendung statistischer Methoden in der Bio-
logie
Mathematikunterricht 1960/3, 83-103
- BECK, A.B. and K. SHEARD (1949)
The copper and nickel content of the blood of the
Western Australian marine crayfish (Panulirus
longipes (M. Edwards) and of Seaweeds
J. exp. Biol. 27, 308-312
- BERNARD, F.J. and C.E. LANE (1963)
Effects of copper ion on oxygen uptake by plank-
tonic cyprids of the barnacle, Balanus amphitrite
niveus
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 113, 418-420
- BIERI, R. and D.H. KRINSLEY (1958)
Trace elements in the pelagic coelenterate, Velella
lata
J. Mar. Res. 16, 246-254
- BOWNESS, J.M. and R.A. MORTON (1952)
Distribution of copper and zinc in the eyes of
freshwater fishes and frogs. Occurrence of metals
in melanin fractions from eye tissues
Biochem. J. 51, 530-535

- BOWNESS, J.M., R.A. MORTON, M.H. SHAKIR and A.L. STUBBS (1952)
Distribution of Copper and Zinc in Mammalian Eyes.
Occurrence of Metals in Melanin Fractions from Eye Tissues
Biochem. J. 51, 521-530
- Van BRUGGEN, E.F.J., V. SCHUITEN, WIEBENGA, GRUBER (1963)
Structure and properties of hemocyanins. III. Electron micrographs of hemocyanins from different Gastropoda and Crustacea
J. molec. Biol. 7, 249-253
- BRYAN, G.W. (1964)
Zinc regulation in the lobster Homarus vulgaris.
I. Tissue zinc and copper concentrations
J. mar. biol. Ass. U.K. 44, 549-563
- BURTON, R.F. (1965)
Possible factors limiting the concentration of haemocyanin in the blood of the snail Helix pomatia L.
Canadian J. Zool. 43, 433-438
- COHEN, L.B. and K.E. Van HOLDE (1964)
Physical Studies of Hemocyanins. II. A Comparison of the Hemocyanin and Apohemocyanin of Loligo pealei
Biochemistry 3, 1809-1813
- CORNER, E.D.S. and B.W. SPARROW (1956)
The modes of action of toxic agents. I. Observations on the poisoning of the certain crustaceans by copper and mercury
J. mar. biol. Ass. U.K. 35, 531-548
- CROWLEY, G.J. (1963)
Studies in arthropod serology I. Changes in hemolymph composition as related to the ecdysal cycle
Wasmann J. Biol. 21, 177-191
- CULKIN, F. and J.P. RILEY (1958)
The occurrence of gallium in marine organisms
J. mar. biol. Ass. U.K. 37, 607-615

- DAWSON, C.R. et MALETTE, M.E. (1945)
The copper proteins
Adv. Protein Chem. 2, 179-248
- DECLEIR, W. (1961)
The localisation of copper in agar gel electrophoretic patterns of crustacean blood
Naturwiss. 48, 102-103
- DECLEIR, W. (1965)
Electrophorese van koperproteïnes uit het bloed van krab Cancer pagurus
Arch. int. Physiol. Biochim. 73, 540-541
- DENUCE, J.M. and E. KÜHN (1962)
Comparative serology of North Sea Crustacea
Protides of the Biological Fluids 10, 205-207
- DESCHIENS, R., D. BERTRAND et V. MOLINARI (1958)
Capacité d'accumulation de certains métaux par les mollusques de la famille des Planorbides
C.r.Soc. Biol. (Paris) 151, 1356-1358
- DOERFFEL, K. (1962)
Beurteilung von Analysenverfahren und -Ergebnisse
Springer-Verlag, J.F. BERGMANN München 1962
- EDEN, A. and H.M. GREEN (1940)
Microdetermination of Copper in Biological Material
Biochem. J. 34, 1202-1208
- FLASCHENTRÄGER, B. und E. LEHNARTZ (1951)
Physiologische Chemie, ein Lehr- und Handbuch
Springer-Verlag 1951
- FLODIN, P. and J. PORATH (1954)
Zone electrophorese in starch columns
Biochim. et Biophys. Acta 13, 175-182
- FRAGA J. de AZEVEDO et F.A. CARVAO GOMES (1956)
L'application des radio-isotopes à l'étude du métabolisme des mollusques d'eau douce (Gastropoda pulmonata)
Ann. Soc. belge Méd. trop. 36, 609-616

- FRIEDEN, E., OSAKI, S. and H. KOBAYASHI (1965)
Copper Proteins and Oxygen. Correlation between
structure and function of copper oxidases
J. gen. Physiol. 49, 213-252
- GHIRETTI, F. e U. VIOLANTE (1964)
Ricerche sul metabolismo del rame in Octopus
vulgaris
Bolletino di Zool. 31, 1081-1092
- GHIRETTI-MAGALDI, A., A. GIUDITTA and F. GHIRETTI (1958)
Pathways of terminal respiration in marine inver-
tebrates. I. The respiratory system in cephalopods
J. cell. comp. Physiol. 52, 389-429
- GLASS, B. (1950) in:
Copper Metabolism A Symposium on animal, plant
and soil relationships
Herausgegeben von Mc ELROY, D.W. & B. GLASS (1950)
The John Hopkins Press Baltimore
- HAYASHI, A. (1961 a)
Biochemical studies on the trace elements in Magaki
(Ostrea gigas). I. Seasonal variation in meat
J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. A-II 25, 337-345
- HAYASHI, A. (1961 b)
Biochemical studies on the trace elements in Magaki
(Ostrea gigas). II. Distribution in different Parts
of Meat.
J. Sci. Hiroshima Univ., Ser. A-II 25, 347-350
- HINSBERG, K. und K. LANG (1957)
Medizinische Chemie
3. Aufl. 1957 München: Urban & Schwarzenberg
- HOLDE Van, K.E. and L.B. COHEN (1964)
Physical studies of Hemocyanins. I. Characterization
and Subunit Structure of Loligo pealei Hemocyanin
Biochemistry 3, 1803-1808
- HOLM-JENSEN, IB (1948)
Osmotic regulation in Daphnia magna under physiolo-
gical conditions and in the presence of heavy metals
Kgl. Danske Videns. Selskab Biol. Med. 20, 1-63

- HORN, E.C. and KERR, M.S. (1963)
Hemolymph Protein and Copper Concentration of
Adult Blue Crabs (Callinectes sapidus Rathurn)
Biol. Bull. 125, 499-507
- IORST, W. (1954)
Transport und Bindung im Serum
Klin. Wochenschrift II, 961-964
- JANDA, V. und J. BABIČKA (1935)
Polarographische Bestimmung der intravitalen Re-
sorption des Kupfers aus verdünnten Lösungen von
CuCl₂ bei Asellus aquaticus
Mem. Soc. Zool. Tchécosl. Prague, 3, 84-89
- JOUBERT, F.J. (1954)
Haemocyanin of the crawfish (Jasus lalandii)
Biochim. Biophys. Acta 14, 127-135
- KERKUT, G.A., P.M. MORITZ and K.A. MUNDAY (1961)
Variations of copper concentrations in Carcinus
maenas
Cah. Biol. Mar. 2, 399-408
- KERKUT, G.A. and K.A. MUNDAY (1962)
The effect of copper on the tissue respiration
of the crab Carcinus maenas
Cah. Biol. Mar. 3, (1), 27-35
- KUBOWITZ, F. (1938)
Spaltung und Resynthese der Polyphenoloxydase
und des Hämocyanins
Biochem. Z. 299, 32-57
- LAUFER, M.A. and L.G. SWABY (1955)
The Size, Shape, and Hydration of Lobster Hemocyanin
Biol. Bull. 108, 290-295
- LINDER, A. (1956)
Statistische Methoden für Naturwissenschaftler,
Mediziner und Ingenieure
3. Auflage Basel : Birkhäuser

- LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR and R.J. RANDALL (1951)
Protein Measurements with the FOLIN Phenol Reagent
J. biol. Chem. 193, 265-275
- LONTIE, R., V. BLATON, M. ALBERT and B. PEETERS (1965)
Reconstitution of Helix pomatia haemocyanin with
the copper (I) acetonitrile complex
Arch. int. Physiol. et Biochim. 73, 150-152
- MARKS, G.W. (1938)
The copper content and copper tolerance of some species of molluscs of the Southern Californian Coast
Biol. Bull. 75, 224-237
- Mc ELROY, D.W. and B. GLASS (1950)
Copper Metabolism
A Symposium on animal, plant and soil relationships
The John Hopkins Press Baltimore
- MIYAWAKI, M., M. MATSUZAKI and N. SASAKI (1961)
Histochemical studies on the hepatopancreas of the crayfish, Procambarus clarkii
Kumamoto J. Science Ser. B Sect. 25, 161-169
- MIYAWAKI, M. and S. TANOUE (1962)
Electron microscopy of the hepatopancreas in the crayfish, Procambarus clarkii
Kumamoto J. Science Ser. B Sect. 2, 6, 1-11
- NEUMANN, P.Z. and M. SILVERBERG (1966)
Active Copper Transport in Mammalian Tissues -
a Possible Role in Wilson's Disease
Nature 210, 414
- NEUMANN, P.Z. and M. SILVERBERG (1967)
Metabolic Pathways of Red Blood Cell Copper in
Normal Humans and Wilson's Disease
Nature 213, 775-779
- OGURA, K. (1959)
Midgut Gland Cells Accumulating Iron or Copper
in the Crayfish, Procambarus clarkii
Annot. Zool. Jap. 32, 133-142

- OKAMOTO und UTAMURA (1938)
Chelatbildung mit Rubeanwasserstoffsäure
RAUEN : Biochemisches Taschenbuch II, 485 (1956)
- PETERS, R.A., M. SHORTHOUSE and J.M. WALSHE (1965)
The effect of Cu^{2+} on the membrane (Na^+ , K^+) ATPase
and its relation to the initiation of convulsions
Biochem. J. 96, 47
- PICKETT, S.M., A.F. RIGGS and J.L. LARIMER (1966)
Lobster Hemocyanin : Properties of the Minimum
Functional Subunit and of Aggregates
Science 151, 1005-1007
- POULSON, D.F., V.T. BOWEN, R.M. HILSE and A.C.
RUBINSON (1952)
The copper metabolism of Drosophila
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 38, 912-921
- PRYOR, C.W. and C.A. LEONE (1952)
Serological Comparisons of Astacuran Crustacea
Biol. Bull. 103, 433-445
- PYEFINCH, K.A. and J.E. MOTT (1948)
The sensitivity of barnacles and their larval to
copper and mercury
J. exp. Biol. 25, 276-298
- RAWLINSON, W.A. (1940)
Cristalline hemocyanin :
some physical and chemical constants
Austral. J. exp. Biol. Med. Sci. 18, 131-140
- REDFIELD, A.C., T. COOLIDGE and A.L. HURD (1926)
The transport of oxygen and carbon dioxide by
some blood containing hemocyanin
J. biol. Chem. 69, 475-509
- REDFIELD, A.C., T. COOLIDGE and H. MONTGOMER (1928)
The respiratory proteins of the blood. II. The
combining ratio of oxygen and copper in some
bloods containing hemocyanin
J. biol. Chem. 76, 197-205

- REDFIELD, A.C., G. HUMPHREYS et E. INGALLS (1929)
The respiratory proteins of the blood. IV. The
buffer action of hemocyanin in the blood of
Limulus polyphemus
J. biol. Chem. 82, 759-773
- REDFIELD, A.C. (1934)
The haemocyanins
Biol. Rev. 9, 175-212
- REDMOND, J.R. (1955)
The respiratory function of hemocyanin in crustacea
J. cell. comp. Physiol. 46, 209-247
- WIESER, W. (1961 a)
Copper in isopods
Nature (Lond.) 191, 1020
- WIESER, W. und H. MAKART (1961 b)
Der Sauerstoffverbrauch und der Gehalt an Ca, Cu
und einigen anderen Spurenelementen bei terrestri-
schen Asseln
Z. Naturforschung 16 b, 816-819
- WIESER, W. (1965 a)
Electrophoretic Studies on Blood Proteins in an
Eccological Series of Isopod and Amphipod Species
J. mar. biol. Ass. U.K. 45, 507-523
- WIESER, W. (1965 b)
Elektrophoretischer Nachweis von Hämocyanin und an-
deren Proteinen im Blut von Isopoden und Amphipoden
Naturwiss. 52, 133-134
- WIESER, W. (1966)
Copper and the role of Isopods in degradation of
organic mater
Science 153, 67-69
- ZUCKERKANDL, E. (1957 a)
La teneur en cuivre de l'hémolymphe de Maia squi-
nado aux divers stades d'intermue
C.r.Soc.Biol. (Paris) 151, 460-463

ZUCKERKANDL, E. (1957 b)

La teneur en oxygène de l'hémolymphe artérielle
de Maia squinado aux divers stades d'intermue

C.r.Soc.Biol. (Paris) 151, 524-528

ZUCKERKANDL, E. (1957 c)

La teneur en cuivre de l'hépatopancréas de Maia
squinado aux divers stades d'intermue

C.r.Soc.Biol. (Paris) 151, 676-679

ZUCKERKANDL, E. (1957 d)

L'économie du cuivre chez Maia squinado au cours
du cycle d'intermue

C.r.Soc. Biol. (Paris) 151, 850-853

Lebenslauf

Ich wurde am 25. März 1939 in Neuzelle, Kreis Fürstenberg Oder, als Sohn des kaufmännischen Angestellten Ulrich Warnatsch und seiner Frau Emma Warnatsch, geb. Klein, geboren. Meine Mutter starb am 28. Mai 1939. Mein Vater ist 1945 gefallen.

Ich besuchte von 1945 - 1953 die Grundschule Neuzelle und bestand nach vier Oberschuljahren am 29. Juni 1957 die Reifeprüfung in StalinStadt (heutigem Eisenhüttenstadt). Ich verließ darauf die SBZ und bestand nach neunmonatigem Ergänzungskursus am 24. Juni 1958 die Anerkennungsprüfung an der Diesterweg-Schule in Berlin-Wedding.

Meine Immatrikulation an der Freien Universität erfolgte am 20. Oktober 1958. Am 4. Februar 1965 habe ich die Erste (Wissenschaftliche) Staatsprüfung für das Amt des Studienrats vor dem Wissenschaftlichen Landesprüfungsamt Berlin mit den Fächern Biologie (Zoologie), Chemie, Leibeserziehung, Philosophie und Pädagogik bestanden, um mich seit 22. Februar 1965 am II. Zoologischen Institut bei Prof. Dr. K. URICH auf die Promotion vorzubereiten.

Meine akademischen Lehrer in der Zoologie waren die Herren Professoren Günther, Herter, Ulrich, Urich, Peus, Kemper und Kümmel. Botanik studierte ich bei den Herren Professoren Drawert, Eckhardt, Reinert, Mattick und Frau Professor Thielke. Genetik und Allgemeine Biologie studierte ich bei Herrn Professor Lüers, Anthropologie bei Herrn Professor Büchi, Chemie bei den Herren Professoren Manecke, Lautsch, Jahr, Schenk, Funk und Vetter, Physik bei Herrn Professor Lassen. Meine akademischen Lehrer in den philosophischen Fächern waren Frau Professor Kanthack und die Herren Professoren Weisedel, Landmann, Borinski, Luckow, Müller und Lennert.

Am 19. November 1965 schloß ich die Ehe mit Frau Monika Warnatsch, geb. Rennicke.

Dietrich Warnatsch

